

# **“UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA”**

**Nuevos tiempos. Nuevas ideas**



**“FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICA”**

**“EFECTO ANTIMICÓTICO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS  
HOJAS SECAS DE *Laurus nobilis* (LAUREL) EN CEPAS DE  
*CÁNDIDA ALBICANS*, IN VITRO.”**

**Tesis para optar al Título Profesional de Químico Farmacéutico  
y Bioquímico**

**TESISTAS:**

**CRUZ VALVERDE, JULIA LUCIA**

**QUISPE CAUNALLA, CECILIA**

**ASESOR:**

**MG. Q.F. TEÓFILO CHIRE MURILLO**

**Lima – Perú**

**2018**

## **DEDICATORIA**

A Dios, por darme las fuerzas en todo momento y culminar de manera satisfactoria mis objetivos planteados en ésta etapa de mi vida.

A mi hija, por depositar su confianza en mí, y por ser mi motor para seguir creciendo profesionalmente.

**Julia Lucia.**

A mi familia por su apoyo incondicional en el rumbo de mi carrera profesional, brindándome fuerza y confianza.

A mis compañeros y profesores de la facultad, las gracias por su inmenso apoyo.

**Cecilia.**

## **AGRADECIMIENTO**

A nuestra Universidad Inca Garcilaso de la Vega, por darnos la oportunidad de seguir creciendo profesionalmente y; así mismo a todos los docentes de la Facultad de Farmacia y Bioquímica que durante nuestra vida estudiantil supieron entregarnos sus sabios conocimientos y consejos.

A nuestro asesor de Tesis, Mg.Q.F. Teófilo Chire Murillo, por su valioso tiempo, apoyo, orientación y generosidad. Por compartir su amplia experiencia y hacer posible la culminación de la presente investigación.

**Cecilia y Julia Lucia.**

## ÍNDICE GENERAL

Dedicatoria

Agradecimientos

Índice de Tablas

Índice de Figuras

Índice de Anexos

Resumen

Abstract

Introducción .....1

**CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....2**

1.1 Descripción de la Realidad Problemática .....2

1.2 Formulación del Problema. ....2

1.2.1. Problema General..... 2

1.2.2. Problemas Específicos.....3

1.3 Objetivos de Investigación .....3

1.3.1. Objetivo General .....3

1.3.2. Objetivos Específicos .....3

1.4 Justificación e importancia de estudio .....4

**CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO .....5**

2.1 Antecedentes de la investigación .....5

2.1.1 Nacionales .....5

2.1.2 Internacionales .....	6
2.2 Bases Teóricas .....	7
2.3 Formulación de Hipótesis .....	20
2.3.1. Hipótesis General.....	20
2.3.2. Hipótesis Específicas.....	20
2.4 Variables .....	21
2.4.1 Tabla de Operacionalización de Variables.....	21
2.5 Marco Conceptual .....	22
<b>CAPÍTULO III: METODOLOGÍA.....</b>	<b>24</b>
3.1 Tipo de Investigación .....	24
3.1.1. Tipo.....	24
3.1.2 Nivel.....	24
3.1.3 Diseño.....	24
3.2 Población y Muestra.....	25
3.2.1. Población .....	25
3.2.2. Muestra .....	25
3.3. Técnicas e instrumentos de recolección de datos .....	25
3.4. Materiales, reactivos y equipos .....	25
3.5. Procedimiento Experimental.....	27
3.5.1 Recolección de material botánico.....	27
3.5.2 Obtención del extracto de las hojas de Laurel .....	27
3.5.3 Tratamiento del material botánico.....	27
3.5.4 Preparación del extracto etanólico de las hojas de <i>Laurus nobilis</i> .....	27

3.5.5 Tratamiento de la muestra.....	28
<b>3.5.6 SCREENING FITOQUÍMICOS.....</b>	<b>29</b>
3.6 Estudio Microbiológico.....	29
3.6.1 Obtención de Cepas.....	29
3.6.2 Desarrollo del Método.....	29
 <b>CAPÍTULO IV: PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS .....</b>	<b>32</b>
4.1 Presentación de Resultados .....	32
4.2 Discusión de Resultados .....	42
 <b>CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....</b>	<b>44</b>
5.1 Conclusiones .....	44
5.2 Recomendaciones.....	45
Referencias Bibliográficas.....	46

## ÍNDICES DE FIGURAS

Figura 1. Laurel ( <i>Laurus nobilis</i> L.).....	9
Figura 2. <i>Cándida albicans</i> .....	14
Figura 3. Sitio de acción de los antimicóticos .....	17
Figura 4. Evaluación del Efecto antimicótico del extracto de Laurel y controles .....	35
Figura 5. Evaluación del efecto antimicótico del extracto de hojas de laurel a distintas concentraciones .....	36
Figura 6. Hojas lavadas de <i>Laurus nobilis</i> .....	50
Figura 7. Hojas de <i>Laurus nobilis</i> en la estufa.....	50
Figura 8. hojas trituradas de <i>Laurus nobilis</i> .....	51
Figura 9. Hojas pulverizadas de <i>Laurus nobilis</i> .....	51
Figura 10. Filtrato del extracto de <i>Laurus nobilis</i> .....	52
Figura 11. Extracto en estufa de <i>Laurus nobilis</i> .....	52
Figura 12. Agar Mueller Hilton plaqueado y listo para ser inoculado.....	53
Figura 13. Inoculación del microorganismo en la placa .....	53
Figura 14. Realizando hoyos en el agar .....	54
Figura 15. Placa con los pocillos listos .....	54
Figura 16. Muestra a tres diluciones .....	55
Figura 17. Cepa <i>Cándida albicans</i> ATCC .....	55
Figura 18. Microorganismo en solución .....	56
Figura 19. Observación de la turbidez basada en escala de Macfarland .....	56
Figura 20. Agar Mueller Hinton plaqueado y listo para ser inoculado .....	57
Figura 21. Inoculación del microorganismo en la placa .....	57

Figura 22. Placa con los pocillos listos .....	58
Figura 23. Aplicación de la muestra al 25% en los discos .....	58
Figura 24. Aplicación de la muestra al 50% en los discos .....	59
Figura 25. Aplicación de la muestra al 100% en los discos.....	59
Figura 26. Colocación de los discos en las placas .....	60
Figura 27. Crecimiento del halo inhibitorio de la muestra al 25% .....	60
Figura 28. Crecimiento del halo inhibitorio de la muestra al 50% .....	61
Figura 29. Crecimiento del halo inhibitorio de la muestra al 100%.....	61
Figura 30. Foto en el laboratorio de microbiología.....	62



## ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
TABLA 1: Clasificación de los anti fúngicos por su estructura química.....	17
TABLA 2: Clasificación según su mecanismo de acción.....	18
TABLA 3: Variables e indicadores.....	21
TABLA 4: Resultados del ensayo de solubilidad.....	32
TABLA 5: Resultado del estudio Fitoquímico.....	33
TABLA 6: Resultados del Extracto etanólico de Laurel como antimicótico.....	34
TABLA 7: Comparación del Efecto antimicótico del Extracto de hojas de Laurel y el alcohol etílico.....	34
TABLA 8: Evaluación del efecto antimicótico del extracto de hojas de laurel a distintas concentraciones.....	35
TABLA 9: Estadística Descriptiva de los Halos de inhibición encontrados de las hojas secas <i>Laurus nobilis</i> (Laurel) en cepas de <i>Cándida albicans</i> , In vitro.....	37
TABLA 10: prueba de homogeneidad de varianza de los halos de inhibición encontrados en las hojas secas de <i>Laurus nobilis</i> (laurel) en <i>Cándida albicans</i> .....	38
TABLA 11: Prueba de ANOVA de los Halos de inhibición encontrados de las hojas secas <i>Laurus nobilis</i> (Laurel) en cepas de <i>Cándida albicans</i> , In Vitro... ..	39
TABLA 12: Comparaciones múltiples de la prueba de Tukey de los Halos de inhibición encontrados de las hojas secas <i>Laurus nobilis</i> (Laurel) en cepas de <i>Cándida albicans</i> , In Vitro.....	40
TABLA 13: Prueba de Subconjuntos de Datos de Tukey de los Halos de inhibición encontrados de las hojas secas <i>Laurus nobilis</i> (Laurel) en cepas de <i>Cándida albicans</i> , In Vitro.....	41

## ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Protocolo de Análisis .....	49
Anexo 2. Fotos de la Técnica Analítica Extracto Etanólico de hojas de Laurel .....	50
Anexo 3. Fotos de Análisis del efecto antimicótico.....	53
Anexo 4. Certificación botánica.....	63
Anexo 5. Ficha de observación AD-HOC de prueba de solubilidad.....	64
Anexo 6. Ficha de observación AD-HOC del Screening fitoquímico del extracto etanólico de hojas secas de <i>Laurus nobilis</i> (LAUREL).....	65
Anexo 7. Ficha de observación AD-HOC de recolección de datos del efecto antimicótico del extracto de hojas secas de <i>Laurus nobilis</i> (Laurel).....	66
Anexo 8. Ficha de validación por juicio de experto N°1.....	67
Anexo 9. Ficha de validación por juicio de experto N°2.....	68
Anexo 10. Ficha de validación por juicio de experto N°3.....	69
Anexo 11. Matriz de consistencia.....	70

## RESUMEN

El presente estudio tiene como objetivo evaluar la actividad antimicótica del extracto etanólico de las hojas secas de ***Laurus nobilis* (Laurel)** en cepas de ***Candida albicans***. Para determinar el efecto antimicótico se utilizó el método de Difusión de Disco en agar (kirby-bauer), en cultivos de ***Candida albicans* ATCC**. Las cepas de ***Candida albicans*** fueron sembradas en Agar Mueller Hinton, con la ayuda de una espátula Drigalsky, como muestra de investigación se usó el extracto etanólico de las hojas de ***Laurus nobilis* (Laurel)** a diferentes concentraciones: 100%, 50%, y 25%. Se hizo 3 tratamientos y 3 repeticiones por cada tratamiento, como control positivo se utilizó el fluconazol, y como control negativo se utilizó el alcohol etanólico al 96%. Las placas tratadas se incubaron por 24 horas, para luego realizar la lectura de los halos de inhibición en las placas correspondientes, la medición se realizó con un vernier digital. En los datos del resultado final se observa que la placa con el extracto etanólico de ***Laurus nobilis*** en una concentración de 100% presentó un halo de inhibición con promedio de 25 mm, el cual es catalogado como muy sensible. El extracto etanólico de ***Laurus nobilis*** al 50% demostró tener mediana actividad antimicótica catalogado como sensible, con un halo de inhibición con promedio de 15.33 mm y el extracto etanólico de ***Laurus nobilis*** al 25% presentó un halo de inhibición con promedio de 10.33 mm, catalogado como nulo según la escala de Duraffourd. Llegando a la conclusión que el extracto de ***Laurus nobilis* (laurel)** presenta efecto antimicótico frente a cepas de ***Candida albicans***, in vitro.

**Palabras Claves:** *Laurus nobilis*, *Candida albicans*, antimicótico.

## ABSTRACT

The objective of this study is to evaluate the antifungal activity of the ethanolic extract of the dried leaves of ***Laurus nobilis* (Laurel)** in ***candida albicans*** strains. To determine the antifungal effect, the Disc Dissemination method on agar (Kirby-Bauer) in crops ***Candida albicans* ATCC**. The ***candida albicans*** strains were seeded in Agar Mueller Hinton, with the help of a Drigalsky spatula, as a research sample the ethanolic extract of the leaves of *Laurus nobilis* (Laurel) was used at different concentrations: **100%, 50%, and 25 %**. There were 3 treatments and 3 repetitions for each treatment, as a positive control, fluconazole was used, and 96% ethanolic alcohol was used as a negative control. The treated plates were incubated for 24 hours, to then read the inhibition rings on the corresponding plates, the measurement was made with a digital vernier. In the data of the final result it is observed that the plaque with the ethanolic extract of ***laurus nobilis*** in a concentration of 100% presented a halo of inhibition with an average of 25 mm, which is classified as very sensitive. The ethanol extract of 50% ***laurus nobilis*** showed to have medium antifungal activity classified as sensitive, with a halo of inhibition with an average of 15.33 mm and the ethanolic extract of *Laurus nobilis* to 25% presented a halo of inhibition with an average of 10.33 mm, cataloged as null according to the Duraffourd scale. It was concluded that the extract of ***laurus nobilis* (laurel)** has an antifungal effect against strains of ***candida albicans***, in vitro.

**Key words:** *Laurus nobilis*, *Candida albicans*, antifungal.

## INTRODUCCIÓN

Una de las principales infecciones micóticas que constituye un problema sanitario de gran alcance es la Candidiasis.

La ***Candida albicans*** es la especie que en su mayoría produce infecciones micóticas y estas son cada vez más predominantes.

Una de las especies de plantas de mayor consumo en el país es el ***Laurus nobilis* (laurel)**, cuyo consumo se debe a sus cualidades culinarias y por los beneficios de carácter medicinal. El Laurel contiene sustancias fenólicas, a las cuales se le atribuyen su efecto antimicrobiana y antimicótica.

En base a los conocimientos previos, el presente trabajo tiene como propósito determinar el efecto antimicótico del extracto etanólico de las hojas secas de ***Laurus nobilis* (Laurel)**, en cepas de ***Candida albicans*** a diferentes concentraciones y poder usarlo como tratamiento alternativo.

## CAPÍTULO I

### PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

#### 1.1 Descripción de la realidad problemática.

Las infecciones de micosis de piel y mucosas constituyen un problema de salud que afecta a nivel mundial. Se calcula que al menos, del 5 % al 10 % de las consultas dermatológicas se le atribuye a los daños por infecciones cutáneas y mucosas. <sup>(1)</sup>

La resistencia bacteriana a los antibióticos es un hecho conocido desde hace más de 50 años. Respecto a los hongos, este fenómeno era poco frecuente en los años 80. Sin embargo, en los últimos años el número de casos de micosis con falla terapéutica se ha incrementado en el mundo. <sup>(2)</sup> Esto crea la necesidad de encontrar nuevos compuestos que puedan actuar como antimicóticos. <sup>(3)</sup>

La ***Candida albicans*** se considera una de las infecciones oportunistas más demandantes en humanos. Su incidencia se ha incrementado considerablemente en los últimos 20 años. Las levaduras del género *Cándida* se encuentran en toda sustancia rica en hidratos de carbono simple. <sup>(4)</sup>

Con ésta investigación se pretende contribuir a la solución de éste problema de salud, evaluando el efecto antimicótico del extracto etanólico de las hojas secas de ***Laurus nobilis* (laurel)**, y de ésta manera tener otra alternativa para combatir la ***Candida albicans***.

#### 1.2 Formulación del problema.

##### 1.2.1 Problema general.

¿El extracto etanólico de las hojas secas de ***Laurus nobilis* (laurel)** presenta efecto antimicótico en cepas ***Candida albicans***, in vitro?

### 1.2.2 Problema específico.

1. ¿Cuál es la concentración del extracto etanólico de las hojas secas de ***Laurus nobilis* (laurel)** que presenta efecto antimicótico en cepas de ***Candida albicans***, in vitro?
2. ¿Cuál será el efecto antimicótico del extracto etanólico de las hojas secas de ***Laurus nobilis* (laurel)** frente al fluconazol 25ug en cepas de ***Candida albicans***, in vitro?

### 1.3 Objetivos de la investigación.

#### 1.3.1 Objetivo general.

Determinar si el extracto etanólico de las hojas secas de ***Laurus nobilis* (laurel)** tiene efecto antimicótico en cepas de ***Candida albicans***, in vitro.

#### 1.3.2 Objetivo específico.

1. Determinar que concentración del extracto etanólico de las hojas secas de ***Laurus nobilis* (laurel)** tiene efecto antimicótico en cepas ***Candida albicans***, in vitro.
2. Comparar el efecto antimicótico de las hojas secas de ***Laurus nobilis* (laurel)** con el fluconazol 25ug en cepas de ***Candida albicans***, in vitro.

#### 1.4 Justificación e importancia del estudio.

“El Perú se caracteriza por tener una alta diversidad biológica y cultural. Además, se caracteriza por el uso tradicional de hierbas medicinales, de las cuales en su mayoría, no cuentan con información científica. Una gran parte de la flora vegetal de uso medicinal, no ha sido estudiada en cuanto a los parámetros fisicoquímicos, farmacológicos o toxicológicos, que permitan un mejor aprovechamiento de los recursos naturales con fines terapéuticos”. <sup>(5)</sup>

En el presente estudio, se demuestra el potencial antimicótico de las hojas secas de ***Laurus nobilis* (Laurel)** contra cepas de *Cándida albicans*. Esta evaluación del efecto antimicótico de ***Laurus nobilis*** en ***Candida albicans***, nos proporcionará conocimiento para estudios adicionales, y en última instancia, aportará beneficios clínicos futuros a través del desarrollo de formulaciones con aplicabilidad clínica en el tratamiento de la candidiasis. <sup>(6)</sup>



## CAPÍTULO II

### MARCO TEÓRICO

#### 2.1 Antecedentes de la investigación.

##### 2.1.1 Antecedentes nacionales.

-“Pérez F, et al. (2010). Mezcla de extractos de plantas medicinales: ¿Sinergismo o reacción química? “

El ensayo se demostró cualitativamente, utilizando la cromatografía de capa fina a la mezcla de extractos etanólicos de las hojas de palta (*Persea americana Mill*) - guanábana (*Annona muricata*), a las cuales se realizó una reacción química entre algunos metabolitos secundarios con la formación de un componente nuevo, que podría ser el causante del sinergismo, con el consecuente aumento del efecto medicinal de los mencionados extractos. El nuevo componente tuvo  $R_f = 0,425$ , en la cromatografía de capa fina de sílica gel, usando cloroformo: acetato de etilo (3:7) como sistema de solvente. <sup>(7)</sup>

-“Centurión, J. (2014). Efecto antibacteriano in vitro del extracto aceitoso de *Laurus nobilis* “Laurel” sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923”.

En su estudio sobre “Efecto antibacteriano in vitro del extracto aceitoso de *Laurus nobilis* (laurel) sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923”. El trabajo fue tipo experimental in vitro, para lo cual se empleó cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 del cepario de la sección de Microbiología de la “Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Trujillo.” Tuvo como objetivo demostrar el efecto antibacteriano del aceite esencial de *Laurus nobilis* (laurel) sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, para lo cual se realizó el estudio con tres concentraciones 25%, 50%, 100%. Los resultados obtenidos durante la investigación fueron que los halos de inhibición obtenidos con la concentración al

100% tuvieron una media de 15.1 mm comparado con la escala de Duraffourd, lo que demuestra que es muy sensible para esta concentración; así como los halos de inhibición obtenidos a la concentración de 50% tuvieron una media de 10.1 mm comparado con la escala de Duraffourd, que es sensible para esta concentración, mientras que los halos de inhibición obtenidos con la concentración de 25% tuvieron una media de 5.1 mm comparado con la escala de Duraffourd, en este caso es nula. <sup>(9)</sup>

### 2.1.2 Antecedentes internacionales.

-“**Ocares MA. (2012).** Acción antimicrobiana de extractos crudos de especies de plantas nativas sobre *Escherichia coli* y *Salmonella* spp.

El presente trabajo tiene como objetivo evaluar la capacidad antagonista de éstas especies en cepas de *Escherichia coli* y *Salmonella* spp. Los extractos crudos se obtuvieron a partir del material vegetal, el cual fue secado, pulverizado y puesto en contacto con solventes de diferente polaridad como agua, metanol y cloroformo. Luego se realizaron pruebas microbiológicas de antagonismo in vitro, se utilizó las técnicas de difusión en agar e inhibición en caldo. Los extractos metanólicos de hoja de Lingue (*Persea lingue*), Ñirre (*Nothofagus antártica*), Luma (*Amomyrtus luma*), Picha (*Myrceugenia planipes*) y Meli (*Amomyrtus meli*) presentaron actividad antimicrobiana frente a todas las cepas utilizadas en este estudio, en comparación con los extractos metanólicos de Radal y Notro que sólo presentaron actividad antimicrobiana frente a *Salmonella* entérica serovar Typhimurium ATCC 14028. La prueba de comparación múltiple de Tukey, identificó que los extractos de Lingue, Ñirre y Picha proyectaron actividad antagonista significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) que las otras dos especies con todas las cepas bacterianas estudiadas. Sin embargo, se pudo observar que no existieron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre los extractos de Lingue y Picha frente a la cepa *E. coli* ATCC 25922.” <sup>(10)</sup>

-“Cruz SM. (2013).Evaluación biológica y fisicoquímica de extractos de hojas del complejo laurel (*Litsea glaucescens* Kunth, *L. guatemalensis* Mez y *L. neesiana* (Schauer) Hemsl).”

Esta investigación evaluó la composición fitoquímica de las hojas secas del género *Litsea* y la actividad biológica. Evidenciando que hay presencia antimicrobiana, antifúngica, antiinflamatoria, insecticida, antiviral, citotóxica y antioxidante. En todos los extractos se identificó: flavonoides, alcaloides, cumarinas, saponinas, esteroides, sesquiterpenlactonas. Los procedimientos se realizaron mediante ensayos macro - semimicro y cromatografía en capa fina. Se aislaron e identificaron flavonoides (pinocembrina, isoflavona) y la cumarina (escopoletina) los cuales están relacionados con la actividad antioxidante y antiinflamatoria. Los extractos etanólicos de *L. guatemalensis* presentaron actividad contra *Leishmania amazonensis* a 10 µg/ml y los extractos de *L. neesiana* contra *L. brasiliensis* a 16.8 µg/ml. Los extractos etanólicos de *L. guatemalensis* presentaron actividad antiinflamatoria in vivo a 30 mg/kg de peso.<sup>(11)</sup>

## 2.2 Bases teóricas.

### 2.2.1 Laurel (*Laurus nobilis* L.)

#### 2.2.1.1 Taxonomía.

Taxonomía según el Certificado botánico (ANEXO 4)

- **Reino** : Plantae
- **División** : Magnoliophyta
- **Clase** : Magnoliopsida
- **Subclase** : Magnoliidae
- **Orden** : Laurales
- **Familia** : Lauraceae
- **Género** : *Laurus*
- **Especie** : *Laurus nobilis* L.

#### 2.2.1.2 Historia

El **laurel** es oriundo del Este Mediterráneo y del Asia Menor, desde donde se extendió al resto de Europa y América. Su nombre científico es *Laurus nobilis*.<sup>(13)</sup>

#### 2.2.1.3 Nombres Comunes.

Árbol de Apolo, laurel, aurelar, aurelero, aurero, auré, choriu, lauredo, laurel, laurel, laurel común, laurel de Apolo, laurel de Dafne, laurel del Mediterráneo, laurel hembra, laurel macho.. etc<sup>(14)</sup>



FIGURA 1: *Laurus nobilis* L. (LAUREL)

#### 2.2.1.4 Descripción botánica

El laurel es un arbusto perpetuo, espeso y decorativo, dioico, siempre verde, de 5 a 10 m de alto, de tronco recto con la corteza de color gris y la copa tupida, oscura, ramaje recto; hojas son simples, alternas, lanceoladas u oblongo, de consistencia algo coriácea, amargas y aromáticas, con el borde en ocasiones algo ondulante, ápice agudo y base atenuada. Miden unos 3-9 cm de longitud y tienen corto peciolo. El haz es de color verde oscuro lustroso, en tanto que el envés es más pálido. Las flores están dispuestas en umbelas sésiles de 4 a 6 flores; se muestran en marzo, abril y mayo, son amarillentas. El fruto es drupáceo, ovoide, de 1 a 1,5 cm de longitud, cambiando a un de color negro en la madurez. Mayormente crecen en rocas y bosques de la región mediterránea, cultivadas en todo el mundo. <sup>(14)</sup>

## Usos

### **-uso tradicional**

El laurel es conocido desde la antigüedad como una planta medicinal y tiene muchos beneficios para la salud. De hecho.

-Las infusiones de laurel sirven para tratar diferentes problemas. Entre ellos destaca su uso contra la sinusitis. Y es que, gracias a sus aceites volátiles, facilita la descongestión nasal. Asimismo, se atribuye a esta planta propiedades que facilitan curar la resaca y la intoxicación.

-Para evitar trastornos digestivos debemos añadir un par de hojas de laurel a las comidas o masticar tres hojas de laurel con el estómago vacío antes de las comidas.

-El laurel es utilizado como antiséptico, para tratar los hongos vaginales (se utiliza la infusión de las hojas de laurel para lavado íntimo en ). <sup>(15)</sup>

-El laurel es aperitivo, eupéptico (facilita la digestión) y carminativo (elimina los gases del conducto digestivo), es antirreumático y antiinflamatorio muy efectivo aplicado externamente.

- es utilizado también para tratar problemas del sistema nervioso. La ingesta de las hojas de laurel en grandes cantidades llega a ser toxica.

**-Uso alimenticio.** - las hojas de laurel son utilizadas como condimentos en la gastronomía Europea (particularmente en la cocina Mediterránea), se utiliza en guisos, sopas y reposterías. Las hojas generalmente se pueden utilizar enteras, molidas o triturados con la finalidad de darle un sabor agradable a las comidas.

### 2.2.1.5 Composición química

Las hojas de laurel están constituidos principalmente por el 1,8-cineol (30-60%). El aceite esencial se encuentra presente en las hojas, tronco e incluso en el fruto. En cuanto a la calidad de las hojas de laurel, es bueno saber que su riqueza en aceite esencial se debe grado de insolación. <sup>(16)</sup>

En cuanto a los frutos, contienen: aceite esenciales, lípidos(15%) a partir del cual se obtiene el aceite o “manteca” de laurel de un color verde, constituida por triglicéridos de ácidos grasos principalmente (monoinsaturado-diinsaturados) y algunos saturados (ácidos láurico, oleico, palmítico y linoleico). Los responsables de darle color al fruto son: antocianósidos, 3-O-glucósidos, 3-Orutinósidos de cianidina y peonidina. <sup>(16)</sup>

### 2.2.1.6 Screening Fitoquímico de *Laurus nobilis* (laurel).

Comprobar los principales compuestos químicos presentes en el extracto etanólico de *laurus nobilis* (LAUREL) con la finalidad de observar la reacción del extracto frente a diferentes solventes, analizar los cambios de color y estados de precipitación. <sup>(17)</sup>

#### a.- Compuestos Fenólicos y Taninos:

- **Ensayo del Cloruro Férrico.**

Este ensayo nos permite identificar la presencia de compuestos fenólicos y/o taninos. Se observa una coloración pardo a azul.

- ❑ Se observa una coloración azul al tratar los taninos hidrolizables con cloruro férrico.
- ❑ Se observa una coloración verde al tratar los taninos condensados con cloruro férrico.

#### **b.- Flavonoides:**

- **Ensayo de Shinoda.**

Permite reconocer la presencia de flavonoides. Se agrega 2ml del extracto etanólico + 7 gotas del reactivo (agitamos), colocar un pedacito de limadura de magnesio + 1 gota de ácido clorhídrico al 10%. Después de la reacción se espera 5 minutos. El ensayo se considera positivo cuando hay cambio de coloración a verde petróleo tenue.

#### **c.- Alcaloides**

- **Ensayo de Wagner.**

Permite reconocer la presencia de alcaloides. Se agrega 2mL del extracto etanólico + 3 gotas del reactivo de Wagner. Si la reacción es positiva dará un precipitado color marrón. En el trabajo de investigación realizado por la extracción etanólica de las hojas secas de ***Laurus nobilis*** encontramos moderada presencia de alcaloides.



### 2.2.2 *Candida albicans*.

Hongo con una morfología di mórfico, se desarrolla de distinta manera en función a la temperatura; como levadura normalmente a 37°C está presente en el huésped y como hongo, de aspecto filamentoso a 25°C se encuentra en la naturaleza. Forma parte del filo *Ascomycota* y se reproduce de manera asexual por gemación, con apariencia de levadura muestra un aspecto de células redondas u ovaladas de 3-8 x 2-7 micras de tamaño, congregadas en grupos chicos, en tanto que, con apariencia de hongo filamentoso, las células se alargan y se diversifican tomando la apariencia de filamentos, pseudo-hifas o pseudo-micelio. <sup>(18)</sup>

El dimorfismo le permite eludir los mecanismos de defensa relacionados con la inmunidad celular del huésped. Con apariencia de levadura se comporta como saprófita, viviendo en comunidad con el huésped, en tanto que, con apariencia de hongo filamentoso, actúa como un patógeno ocasionando patologías en el huésped.

Macroscópicamente, en agar Sabouraud, se desarrolla creando colonias blancas, blandas, cremosas y lisas. <sup>(19)</sup>

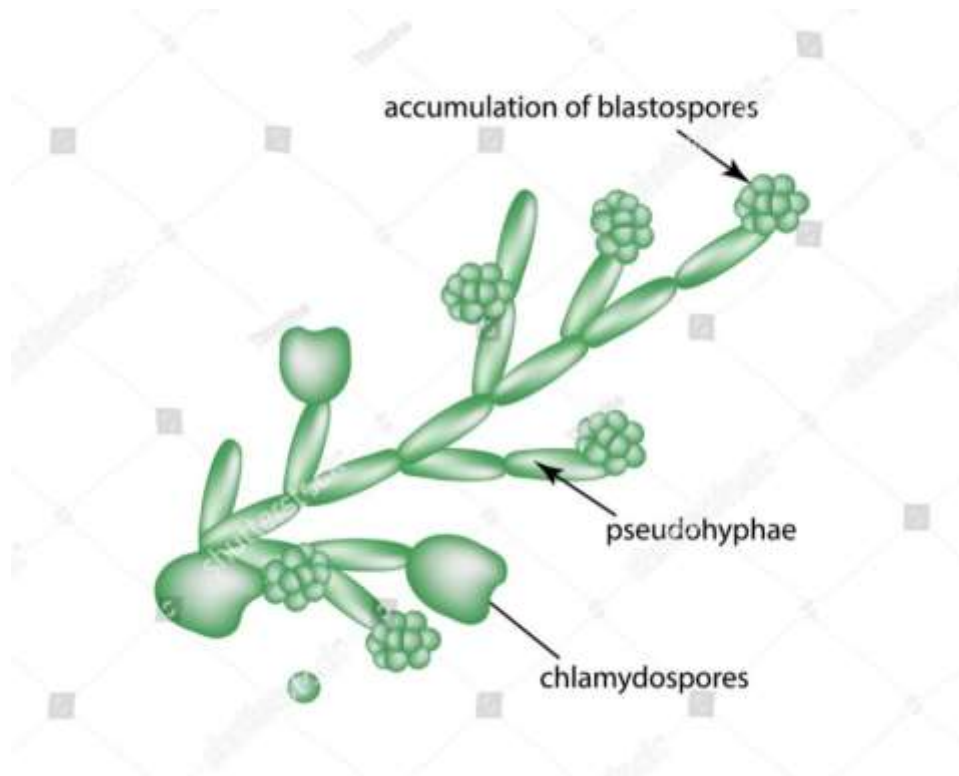


FIGURA 2: *Candida albicans*.

#### 2.2.2.1 Epidemiología.

Considerada una de las patologías más comunes en humanos. Su incidente se incrementó en los últimos 20 años. Las levaduras son responsables del 7,45% de las micosis, el 25% de las micosis superficiales y entre el 75 y 88% de las infecciones fúngicas dentro de los hospitales. Afecta a individuos de cualquier edad, sexo o grupo étnico. <sup>(20)</sup>

Son habitantes usuales del aparato digestivo, respiratorio y regiones mucocutáneas del hombre y animales. El sistema gastrointestinal humano tiene una población pequeña pero constante de *C. albicans*.

Además de *C. albicans*, otras especies tiene la posibilidad de invadir y colonizar la mucosa oral y del tracto gastrointestinal humano como *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. dubliniensis*, y *C. krusei*. En la mucosa vaginal normal se puede aislar *C. albicans* y, con menor frecuencia, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y *C. krusei*. <sup>(21)</sup>

### 2.2.2.2 Vías de infección.

Mayormente las infecciones son de origen endógeno desde los reservorios mucocutáneos o cutáneos, los factores predisponentes para esta frecuencia elevada de infecciones por levaduras son:

- Aumento de la utilización de quimioterapia y de trasplante de medula ósea y otros órganos con inmunosupresión intensa acompañante.
- Internaciones prolongadas en hospitales.
- Cateterismo vascular.
- Administración prolongada de antimicrobianos de amplio espectro.
- Uso prolongado de antimicóticos (resistencias micóticas) <sup>(22)</sup>.

### 2.2.3 Antimicótico.

#### 2.2.3.1 Definición.

Es conocida como una sustancia que tiene como capacidad **evitar la reproducción o el crecimiento de algunos tipos de hongos** que incluso pueden provocar la muerte. Produciendo una variación en los componentes de una célula fúngica que logre bloquear su crecimiento, alterando su posibilidad o aptitud de supervivencia ya sea de forma directa o de forma indirecta, lo que posibilita el desempeño de los sistemas de defensa del huésped. <sup>(23)</sup>

Los antimicóticos son formulas farmacéuticas que permiten combatir a los hongos, también conocidos como micosis. Los hongos microscópicos infectan la piel, las membranas mucosas y el pelo, las uñas. La mayoría de los hongos aparecen en zonas calientes y húmedas (entre los dedos de los pies, los pliegues de la piel en las

personas con sobrepeso, el tracto digestivo). Ciertas formas de antimicóticos utilizados para la micosis son:

- de uso local como cremas, ungüentos, champús o polvos.
- de uso oral como capsulas, tabletas, suspensión. <sup>(28)</sup>

#### **2.2.3.2 Relación estructura-función de los antifúngicos.**

En cuanto a la estructura química de los anti fúngicos presentan gran variedad, por presentar ciclos de 5 átomos en los cuales el nitrógeno o azufre forman parte del ciclo, puede considerarse un grupo farmacóforo, pues en ausencia de esté las moléculas pierden su efecto contra los hongos. En muchos casos la aparición de anillos bencénicos con sustituyentes halogenados como cloro o flúor, cercanos al anillo de imidazol o triazol, ayudan a incrementar la respuesta biológica de la molécula, pues le confieren lipofilia y aumenta la eficacia frente a infecciones micóticas.

Las pirimidinas forman otro grupo con efecto anti fúngica a partir del cual se puede plantear muchos fármacos de igual actividad farmacológica. Las estructuras químicas que forman ciclos en los cuales se repite el grupo amida también le confieren a la molécula actividad anti fúngica, tal es el caso de los lipopéptidos. Otra estructura que ha servido de esquema para la creación de moléculas anti fúngicas es aquella que contiene planos ortogonales, llamadas espiro compuestos y un ejemplo de ello lo es el griseofulvin. <sup>(24)</sup>

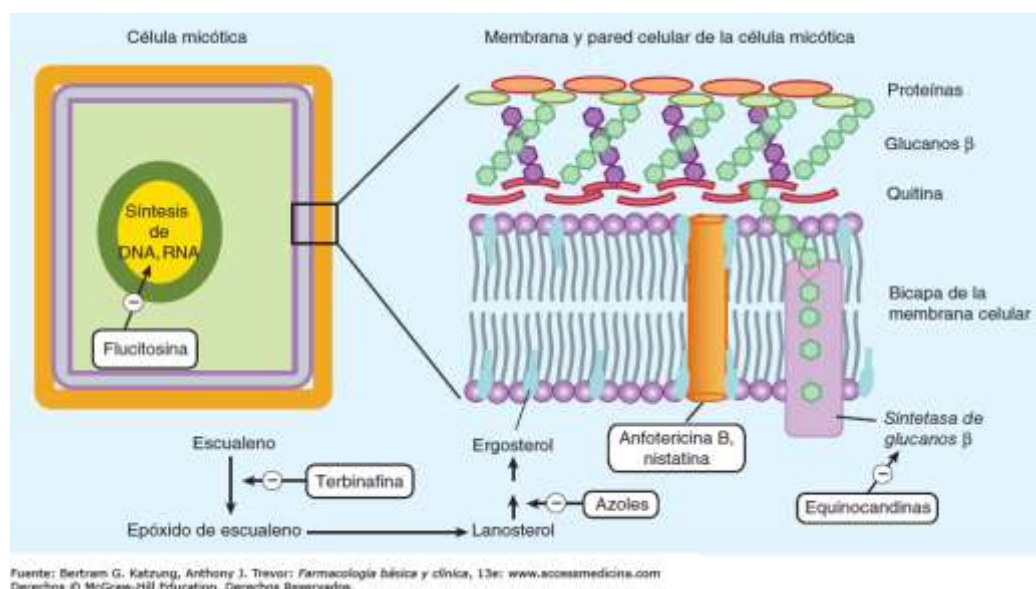


FIGURA 3: Sitio de acción de los antimicóticos.

Los antimicóticos pueden clasificarse según su estructura en: polienos, azoles, alilaminas, entre otros. (Tabla 1); y de acuerdo a su mecanismo de acción (Tabla 2): <sup>(23)</sup>

**TABLA 1: Clasificación de los antifúngicos por su estructura química**

CLASIFICACION DE LOS ANTIFUNGICOS POR SU ESTRUCTURA	
<b>POLIENOS</b>	Nistatina, natamicina, anfotericina B
<b>AZOLES</b>	Imidazol: clotrimazol, <b>ketoconazol</b> . Triazoles: <b>fluconazol</b> , itraconazol Triazoles de segunda generación: boriconazol, rabuconazol, posaconazol
<b>ALILAMINAS</b>	<b>Terbinafina</b> , naltifina
<b>LIPOPEPTIDOS</b>	Papulacandinas Triterpenos, glicosilados Equinocandinas: caspofungina, anidulofungica, micalofungina
<b>PIRIMIDINAS</b>	Flucitosina
<b>OTROS</b>	yoduro de potasio, ciclopirox, grisofulvin

**TABLA 2: Clasificación según su mecanismo de acción.**

<b>ANTIFUNGICOS QUE ACTUAN SOBRE LAS MEMBRANAS CITOPLASMATICA:</b>
• Polienos
• Azoles
• Alilaminas
• Tiocarbamatos
<b>ANTIFUNGICOS QUE ACTUAN SOBRE LA PARED:</b>
• Lipopeptidos
<b>ANTIFUNGICOS QUE ACTUAN SOBRE EL NUCLEO:</b>
• Pirimidinas fluoradas
• Misceláneos

## **MECANISMO DE ACCIÓN**

### **Antimicóticos que actúan sobre las membranas citoplasmáticas:**

#### **❑ Los polienos:**

Actúan alterando la permeabilidad de la membrana lo que permite una pérdida de proteínas, glúcidos y cationes monovalentes y divalentes, causas de la muerte celular <sup>(23)</sup>.

#### **❑ Los azoles:**

Contienen un anillo con átomos de N libres unidos mediante enlace C-N a otros anillos aromáticos. La naturaleza de estos anillos modifica las propiedades fisicoquímicas, efecto terapéutico, toxicidad, etc.<sup>(23)</sup>

#### **❑ Las alilaminas:**

Actúan inhibiendo la enzima escualeno epoxidasa y disminuyen la concentración de ergosterol, aumentando los niveles de escualeno. Como consecuencia, aumenta la permeabilidad de la membrana plasmática, se altera la organización celular y disminuye el crecimiento del hongo.<sup>(23)</sup>

#### ❑ **Los tiocarbamatos:**

Tienen acción fungistática. El compuesto más conocido es el tolnaftato que bloquea la síntesis de ergosterol al inhibir la epoxidación del escualeno. Se emplea en el tratamiento tópico de dermatomicosis, tiñas, intertrigos micóticos, vaginitis micótica.<sup>(23)</sup>

#### **Antimicóticas que actúan sobre la pared celular:**

#### ❑ **Los lipopéptidos:**

Actúan inhibiendo la síntesis de glucanos a través de la inactivación de la enzima 1,3-betaglucano sintetasa, enzima responsable de formar este polímero de la glucosa que es esencial para la estructura de la pared de la célula fúngica. La pared se debilita y se torna incapaz de soportar el estrés osmótico, por lo que la célula muere.<sup>(23)</sup>

#### **Antimicóticas que actúan sobre el núcleo:**

#### ❑ **Las pirimidinas fluoradas:**

Actúan como antimetabolitos. La más conocida de este grupo es la fluocitosina o 5-fluorocitosina que inhibe el crecimiento y reproducción de los hongos. Este fármaco se convierte en 5-fluorouracilo (5-FU), el cual es fosforilado e incorporado al ARN, convirtiéndose en un dexosinucleótido. Este compuesto inhibe a la timidilato sintetasa e impide la síntesis de proteínas de la célula.<sup>(23)</sup>

## **2.3 Formulación de la hipótesis.**

### **2.3.1 Hipótesis general.**

El extracto etanólico de las hojas secas de ***Laurus nobilis*** (laurel) presenta efecto antimicótico en cepas ***Cándida albicans***, in vitro.

### **2.3.2 Hipótesis específica.**

1. La concentración del extracto etanólico de las hojas secas de ***Laurus nobilis*** (laurel) presenta efecto antimicótico en cepas ***Cándida albicans***, in vitro.
2. El extracto etanólico de las hojas secas de ***Laurus nobilis*** (laurel) presenta efecto antimicótico frente al fluconazol 25ug en cepas ***Cándida albicans***, in vitro.



## 2.4 Variables.

### 2.4.1 Variable independiente

Los componentes químicos del extracto etanólico de las hojas secas de ***Laurus nobilis* (Laurel)**

### 2.4.2 Variable dependiente

Efecto antimicótico

## 2.5 Tabla de Operacionalización de variables

TABLA 3: Variables e indicadores

VARIABLES	DIMENCIONES	INDICADORES	ESCALA	INSTRUMENTO
Extracto etanólico de las hojas secas de <b><i>Laurus nobilis</i> (laurel)</b>	Fitoquímica	Concentración 25%,50%,100%	-Control positivo -Control negativo	Ficha de observación AD-HOC
Efecto antimicótico	Microbiológico	<b><i>Cándida albicans</i></b> (Halo inhibitorio)	mm	-Ficha de observación AD-HOC -vernier

### 2.5.1. Operacionalización de variables

La variable efecto antimicótico del extracto etanólico de las hojas de ***Laurus nobilis* (Laurel)**, se ha operacionalizado en búsqueda de inhibir el crecimiento de cepas de ***Cándida albicans*** en cultivos de Mueller Hinton Agar.

## 2.6 Marco Conceptual.

- ❑ **Extracción** : La **extracción** es un proceso de separación de una sustancia que puede disolverse en dos disolventes no miscibles entre sí, con diferente grado de solubilidad y que están en contacto a través de una interface<sup>(29)</sup>

La extracción de muestras vegetales se realiza por diferentes métodos las más utilizadas son: <sup>(29)</sup>

- Extracción con sustancias volátiles: alcohol, cloroformo
- por destilación por arrastre con vapor de agua
- extracción con fluidos supercríticos: bióxido de carbono

- ❑ **Prueba de solubilidad:** es un procedimiento de laboratorio que consiste en validar la solubilidad de algunos compuestos orgánicos.

-Solubilidad.- es la capacidad que tiene una sustancia de disolverse en otra llamada solvente. Expresamente depende de la cantidad de soluto que se puede disolver en una cantidad determinada de disolvente. <sup>(30)</sup>

- ❑ **In vitro:** Davis y col. (2017). <sup>(1)</sup> Es una técnica que consiste en realizar un experimento ya sea en un tubo de ensayo o en un ambiente controlado (laboratorio).

- ❑ **Patógeno:** Nordarse, Rafael y col. (2017) <sup>(2)</sup> Microorganismo que daña a un huésped por invasión, lesión o porque producen sustancias tóxicas.

- ❑ **Mueller Hinton Agar:** Cavalieri, Stephen, y col. (2017) <sup>(3)</sup> Es un medio que carece de inhibidores, sustancia gelatinosa que se usa como medio de cultivo para el crecimiento de una gran cantidad de microorganismos tanto Gram positivos como Gram negativos y hongos.

- ❑ **Halos de inhibición:** cavalieri, Stephen, y col. (2017)<sup>(3)</sup> “Es la región en donde no se produce desarrollo bacteriano en una placa de agar inoculado de gérmenes.”
  
- ❑ ***Laurus nobilis*:** lopez G. (2001) <sup>(13)</sup> Es un arbusto de clase perenne perteneciente a la familia lauraceae.
  
- ❑ ***Cándida albicans*:** Villar j. y Alhambra. (2009) <sup>(20)</sup> Es un hongo di mórfico, que se desarrolla de manera diferente de acuerdo a la temperatura.”
  
- ❑ **Pulverizado:** Massaro RA.(2013)<sup>(31)</sup> es un procedimiento mecánico que sirve para fraccionar el tamaño de la partículas.
  
- ❑ **CMI:** concentración mínima inhibitoria
  
- ❑ **CMF:** concentración mínima fúngica
  
- ❑ **UFC/ml:** Unidades formadoras de colonia por ml.
  
- ❑ **Ug:** Microgramos

## **CAPITULO III**

### **MÉTODO**

#### **3.1 Tipo de investigación.**

##### **3.1.1. Tipo**

La investigación es de tipo “experimental”, ya que se analiza la causa y efecto que generan las variables propuestas en el presente estudio. Para ello, se manipula de manera intencionada la variable independiente (extracto etanólico de las hojas secas de *Laurus nobilis* (laurel) para luego analizar las consecuencias de manipulación que se genera en la variable dependiente (efecto antimicótico). Además, durante los experimentos es muy importante y obligatorio controlar las variables intervinientes de manera rigurosa para saber de qué forma o debido a qué se produce una situación o acontecimiento particular.

##### **3.1.2. Nivel de investigación.**

La presente investigación es de nivel “aplicativo”, puesto que se emplea una serie de instrumentos de medición para registrar los procesos que se generen al manipular una de las variables.

##### **3.1.3. Diseños de investigación.**

Con respecto a esta investigación; tiene un diseño experimental. Donde se tendrá un grupo control y uno experimental. Los mismos que se miden a través de pruebas y fichas de observación para el registro de los hallazgos.

### 3.2. Población y Muestra.

#### 3.2.1. Población.

Estará conformada por las cepas de ***Candida albicans* ATCC 10231**.

#### 3.2.2. Muestra

Se utilizó 3 placas inoculadas con ***Candida albicans* ATCC 10231** con 3 réplicas cada uno.

### 3.3 Técnica e instrumentos de recolección de datos.

Para evaluar el crecimiento inhibitorio de cepas de ***Candida albicans*** en cultivos adecuados, se realizó la medición en mm de los halos de inhibición según el crecimiento antimicótico.

- Para el ensayo de solubilidad se utilizó la ficha de observación AD-HOC (ANEXO 5)
- Para el **screening fitoquímico** de las hojas de ***Laurus nobilis*** (laurel), se utilizó las fichas de observación AD-HOC (ANEXO 6)
- Para el estudio microbiológico del extracto etanólico de las hojas secas de ***Laurus nobilis (laurel)***, se utilizó las fichas de observación AD-HOC (ANEXO 7)

#### 3.3.1 Materiales, reactivos y equipos

##### **Materiales**

- ☐ Vernier.
- ☐ Pinza punta plana.
- ☐ Placas Petri de vidrio estéril.
- ☐ Asa de Drigalsky.
- ☐ Tubos estériles con tapa rosca.
- ☐ Puntas para micropipeta de 20-200 µL y 0.5-5mL.
- ☐ Micropipetas calibradas de 20-200 µL y 0.5-5mL.
- ☐ Sacabocado.
- ☐ Frascos de vidrio de 500mL de capacidad con tapa rosca.
- ☐ Viales de vidrio.

- ☐ Gradilla
- ☐ Pizeta con agua destilada
- ☐ Frascos color ambar

### **Reactivos.**

- ☐ Etanol
- ☐ Mayer
- ☐ Wagner
- ☐ Gelatina
- ☐ Dragendorff
- ☐ Cloruro férrico
- ☐ Molish
- ☐ Fehling
- ☐ Agua destilado

#### **- Medios de cultivo.**

- ☐ Agar nutritivo (Agar Mueller Hinton<sup>4</sup> marca Scharlau)
- ☐ Suero fisiológico estéril (NaCl 0.9%)

#### **- Inóculo.**

Solución de *Candida albicans* ATCC 10231 a una concentración de  $1 \times 10^6$  unidades formadoras de colonias por cada mililitro (UFC/mL) de suero fisiológico.

#### **- Muestra.**

Extracto alcohólico de hojas de laurel al 100%, 50% y 25%.

### **Equipos.**

- ☐ Incubadora 35°C.
- ☐ Autoclave Vertical Digital.
- ☐ Potenciómetro.
- ☐ Baño María.
- ☐ Balanza analítica.
- ☐ Mechero Bunsen.

### 3.5 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

#### 3.5.1 Recolección del material botánico

Se compró 2kg de hojas de laurel del mercado mayorista de la parada del distrito la victoria -Lima. Un ejemplar completo de la planta se llevó al Herbarium para su identificación y determinación taxonómica quedando registrado con N° 37. (ANEXO 4).

#### 3.5.2 Obtención del extracto etanólico de las hojas de *Laurus nobilis* (Laurel)

La obtención del extracto etanólico de las hojas de *Laurus nobilis* (Laurel), se llevó a cabo en la "Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos." En el área de farmacognosia.

#### 3.5.3. Tratamiento del material botánico

- a) **Selección y lavado:** Las hojas fueron lavadas y limpiadas mecánicamente. finalmente se lavaron con abundante agua potable, para luego enjuagar con agua destilada.
- b) **Secado:** las hojas fueron colocadas en una estufa a temperatura de 50 °C por 7 días aproximadamente hasta peso constante.
- c) **Pulverización:** Con la ayuda de un mortero se procede a triturar las hojas secas del laurel obteniendo así la muestra pulverizada.
- d) **Almacenamiento:** El polvo obtenido, se depositó en un frasco polietileno.

#### 3.5.4 Preparación del "extracto etanólico de las hojas secas de *Laurus nobilis* (Laurel)"

El preparado del "extracto etanólico de las hojas secas de laurel" se realizó por el método de maceración. Se pesó 20g de las hojas pulverizadas y se procedió a macerar en un frasco de polietileno por un periodo de dos semanas con 100ml de alcohol etílico al 96°C. Se agitó el frasco mecánicamente cada 6 horas, durante dos semanas, Culminada el tiempo de maceración, se filtró el

macerado. Al líquido filtrado se le llamó extracto etanólico. Finalmente se procede a concentrar el extracto etanólico en la estufa a 50°C reduciéndose hasta la cuarta parte del volumen inicial (25ml). A partir de este extracto obtenido se reconstituyó para realizar los análisis microbiológicos.

### **3.5.5 Tratamiento de la muestra.**

-La muestra está en forma de extracto etanólico y ésta se trabajó a tres concentraciones: 100%, 50% y 25%.

-Para realizar las diluciones a partir del extracto alcohólico se usó alcohol 96°.

-Las diluciones se prepararon de la siguiente manera:

La muestra tal cual es considerada como 100% por lo tanto solo se trasvasó 5mL a un vial para utilizarlo posteriormente. Para hallar las siguientes concentraciones se usó la fórmula:

$$C1 \times V1 = C2 \times V2$$

Donde C: concentración

V: volumen

Por lo tanto, se tomó 2.5 mL de la muestra al 100% y se diluyó hasta 5 mL con etanol para obtener la concentración de 50%.

Se tomó 1.25 mL de la muestra al 100% y se diluyó hasta 5 mL con etanol para obtener la concentración de 25%. También se preparó diluyente en un vial para utilizarlo como control negativo.



### 3.5.6 Ensayo de solubilidad

El ensayo de solubilidad se llevó a cabo en el laboratorio de la Universidad Inca Garcilaso de la Vega, para la prueba se utilizó el instrumento AD-HOC (ANEXO 5)

### 3.5.7 Screening Fitoquímico

Se preparó los reactivos en la universidad inca Garcilaso de la vega. El objetivo es determinar la presencia de compuestos químicos de hojas secas de ***Laurus nobilis***. (Laurel). Para los ensayos se utilizó el instrumento AD-HOC (ANEXO6)

## 3.6 Estudio Microbiológico

### 3.6.1 Obtención de la cepa fúngica

La cepa de ***Candida albicans* ATCC 10231**, fue obtenida del cepario del laboratorio de Microbiología de la Universidad mayor de san marcos (UNMSM). (ANEXO 1)

### 3.6.2. Desarrollo del método.

#### - Preparación del Agar Mueller Hinton.

El agar Mueller - Hinton debe ser preparado con agua destilada de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Auto clavar el agar a 121°C y 15 lb/pg<sup>2</sup> durante 15 minutos. Seguidamente después de auto clavar dejar enfriar en Baño María a 45 - 50°C. Una vez temperado echar el preparado fresco a placas Petri estériles, para darle un fondo uniforme de aproximadamente 4 mm. Esto pertenece a 25- 30 ml para placas de 100 mm de diámetro. Y dejar enfriar a temperatura ambiente. El agar Mueller Hinton debe tener un pH entre 7,2 - 7,4. Esta medición puede realizarse sumergiendo el bulbo del electrodo del potenciómetro en el agar antes de auto clavar.

- **Preparación del inóculo.**

A partir de colonias puras de un cultivo joven del microorganismo *Cándida albicans* ATCC 10231 tomar una cierta cantidad de colonias y diluirlas en un tubo de ensayo conteniendo 10 mL de suero fisiológico (cloruro de sodio 0.9%) de tal manera que la solución resultante tenga una turbidez muy similar al tubo N°1 de la escala de MacFarland el cual corresponde a una concentración de  $3 \times 10^8$  ufc/mL.

A partir de esta última solución realizar una dilución de 1 en 3, para ello de esta solución preparada tomar 3 mL y diluirlo a un volumen total de 9 mL con suero fisiológico en un tubo con tapa rosca, todos los materiales usados deben ser estériles y también el área de trabajo. La solución resultante tendrá una concentración de  $1 \times 10^8$  ufc/mL.

Bajo las mismas condiciones realizar una dilución de 1 en 100 añadiendo 0.1 mL de la solución anterior a un tubo con 9.9 mL de suero fisiológico, la solución resultante tendrá una concentración de  $1 \times 10^6$  ufc/mL.

- **Inoculación de las placas.**

Agregar 100 uL del inóculo preparado ( $1 \times 10^6$  ufc/mL) a cada una de las placas y con la ayuda de una espátula de Drigalsky esparcir el inóculo por toda la placa de tal manera que se obtenga un crecimiento homogéneo, para lo cual se desliza el asa en la placa de manera paralela y bien compacta incluyendo toda la superficie de la misma. Después se repite el método girando la placa  $60^\circ$  dos veces más. Tener cuidado al sembrar las placas de borde a borde, porque de lo contrario puede haber problemas de lecturas.

**- Aplicación de la muestra en las placas inoculadas.**

En cada placa se realizan tres pocillos con la ayuda del sacabocado de diámetro 6mm. Se toma 50µL de la muestra y se agrega en cada pocillo por triplicado en la placa. Los pocillos deben de quedar separados a una distancia de 15 mm del borde y de esta forma evitar superposición de los halos de inhibición.

**- Interpretación de los resultados**

Luego de un día de incubación, las placas son revisadas. Los halos de inhibición deben ser idénticamente circulares y tener una capa homogénea de crecimiento fúngico. Los halos de la zona de inhibición son medidos en milímetros. La medición se realiza con un vernier digital. Los valores de las mediciones por triplicado deben promediarse y compararse con las medidas de los halos de inhibición producidos por el control positivo (fluconazol).

## CAPITULO IV

### PRESENTACIÓN Y ANALISIS DE LOS RESULTADOS

#### 4.1. Presentación de los resultados

##### 4.1.1 Ensayo de solubilidad

El ensayo solubilidad se muestran resumidas en la tabla 4

TABLA 4: Resultados del ensayo de solubilidad.

	DEMOSTRACION	IDENTIFICACION	RESULTADOS
<b>ACETATO DE ETILO</b>	1ml extracto + 1ml del reactivo	Soluble o insoluble	-
<b>CICLOHEXANO</b>	1ml extracto + 1ml del reactivo	Soluble o insoluble	-
<b>METANOL</b>	1ml extracto + 1ml del reactivo	Soluble o insoluble	++
<b>BUTANOL</b>	1ml extracto + 1ml del reactivo	Soluble o insoluble	+
<b>ETER DE PETROLEO</b>	1ml extracto + 1ml del reactivo	Soluble o insoluble	+
<b>ETANOL</b>	1ml extracto + 1ml del reactivo	Soluble o insoluble	++
<b>AGUA DESTILADA</b>	1ml extracto + 1ml del reactivo	Soluble o insoluble	-

Leyenda: Soluble (++), Poco Soluble (+), insoluble (-)

#### 4.1.2 Screening fitoquímico

TABLA 5: Resultados del “screening fitoquímico del extracto etanólico de *laurus nobilis* (Laurel)”

SCREENING FITOQUIMICO				
	REACTIVO	DEMOSTRACION	IDENTIFICACION	RESULTADOS
<b>IDENTIFICACION DE COMPUESTOS FENOLICOS</b>	FeCl <sub>3</sub>	2ml extracto + 5 gotas del reactivo	Cambio de coloración pardo a azul	+++
<b>IDENTIFICACION DE CUMARINAS</b>	NaOH 10%	2ml extracto + 2 gotas del reactivo	Amarillo intenso	--
<b>IDENTIFICACION DE TANINOS</b>	Rvo Gelatina + NaCl	2ml extracto + 5 gotas de reactivo + 3 gotas de NaCl 10%	Coloide	++
<b>IDENTIFICACION DE SAPONINAS</b>	H <sub>2</sub> O	2ml extracto + 1ml de H <sub>2</sub> O destilada agitación por 2 minutos	Forma espuma	--
<b>IDENTIFICACION DE FLAVONOIDES</b>	Limaduras de Magnesio (Mg)	2ml extracto + 7 gotas del reactivo (agitar) colocar 1gota de HCl al 10%	Cambio de coloración a verde petróleo tenue	+++
<b>IDENTIFICACIÓN DE ALCALOIDES</b>	Reactivo Dragendor	2ml extracto + 3 gotas del reactivo	Precipitado color anaranjado	--
	Reactivo Mayer	2ml extracto + 3 gotas del reactivo	Precipitado color blanco lechoso	--
	Reactivo Wagner	2ml extracto + 3 gotas del reactivo	Precipitado color marrón	++

Leyenda: (+ +) Moderado, (+ + +) Abundante, (-) Ausente.

#### 4.1.3 EFECTO ANTIMICÓTICO

Los resultados de efecto antimicótico de las hojas secas de *Laurus nobilis* están descritos en la (tabla 6 y 7).

**TABLA 6: Resultados del extracto etanólico de Laurel como antimicótico.**

MICROORGANISMO	CONTROLES			MUESTRA		
	HALO DE INHIBICION (mm)			EXTRACTO ALCOHOLICO		
	ALCOHOL ETILICO 96°			HALO DE INHIBICION (mm)		
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	0.00	0.00	0.00	100%		
				25	24	26
				50%		
				15	15	16
				25%		
				10	11	10

En la (tabla 6) se puede observar que el extracto etanólico al 100%, presenta un mayor halo de inhibición.

**TABLA 7: Comparación del efecto antimicótico del extracto de hojas de *Laurus nobilis* (Laurel), fluconazol 25ug y el alcohol etílico 96°.**

ANTIMICÓTICOS	DIÁMETRO DEL HALO DE INHIBICIÓN (mm)			PROMEDIO	DSR
	1RA	2DA	3RA		
EXTRACTO ALCOHOLICO DE LAUREL 25%	10.00	11.00	10.00	10.33	0.06
EXTRACTO ALCOHOLICO DE LAUREL 50%	15.00	15.00	16.00	15.33	0.04
EXTRACTO ALCOHOLICO DE LAUREL 100%	25.00	24.00	26.00	25.00	0.04
ALCOHOL ETÍLICO 96°	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
FLUCONAZOL 25 ug	30.00	30.00	30.5	30.17	0.01

En la (tabla 7), se observa que el mayor efecto antimicótico tiene el extracto etanólico a la concentración de 100% pero menor que el control positivo (fluconazol 25 ug).

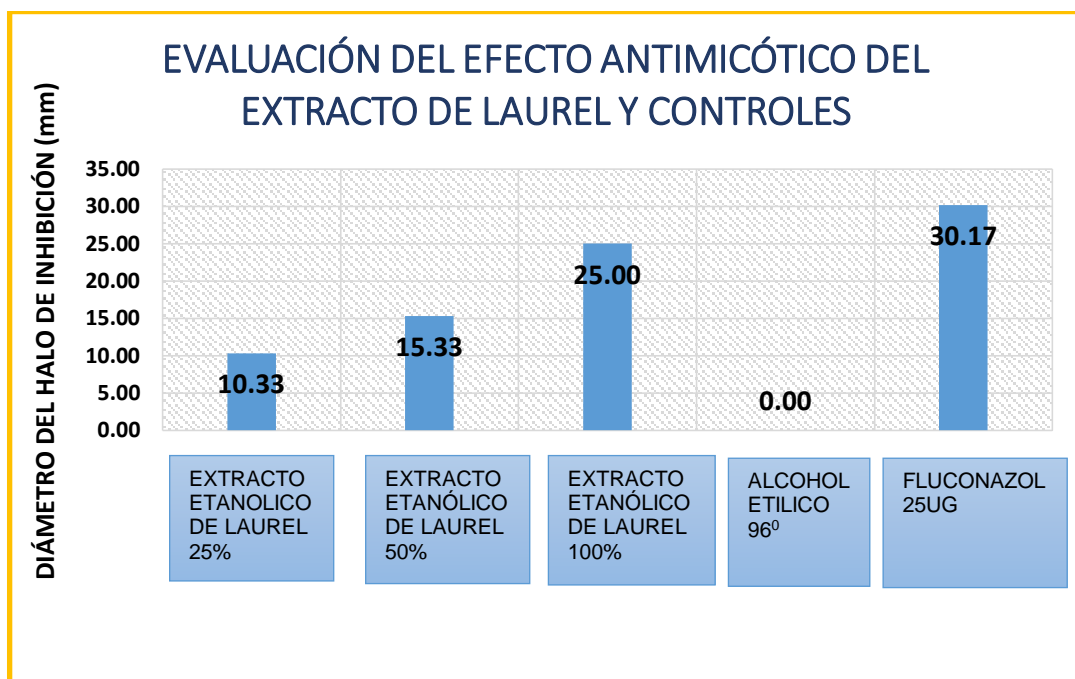


FIGURA 4: Evaluación del Efecto antimicótico del extracto de Laurel y controles

TABLA 8. Evaluación del efecto antimicótico del extracto de hojas de laurel a distintas concentraciones

CONCENTRACIONES	DIAMÉTRO PROMEDIO DEL HALO INHIBITORIO (mm)
EXTRACTO ALCOHOLICO DE LAUREL 25%	10.33
EXTRACTO ALCOHOLICO DE LAUREL 50%	15.33
EXTRACTO ALCOHOLICO DE LAUREL 100%	25.00

En la (tabla 8), se aprecia que, a mayor concentración, mayor es el diámetro del halo inhibitorio.

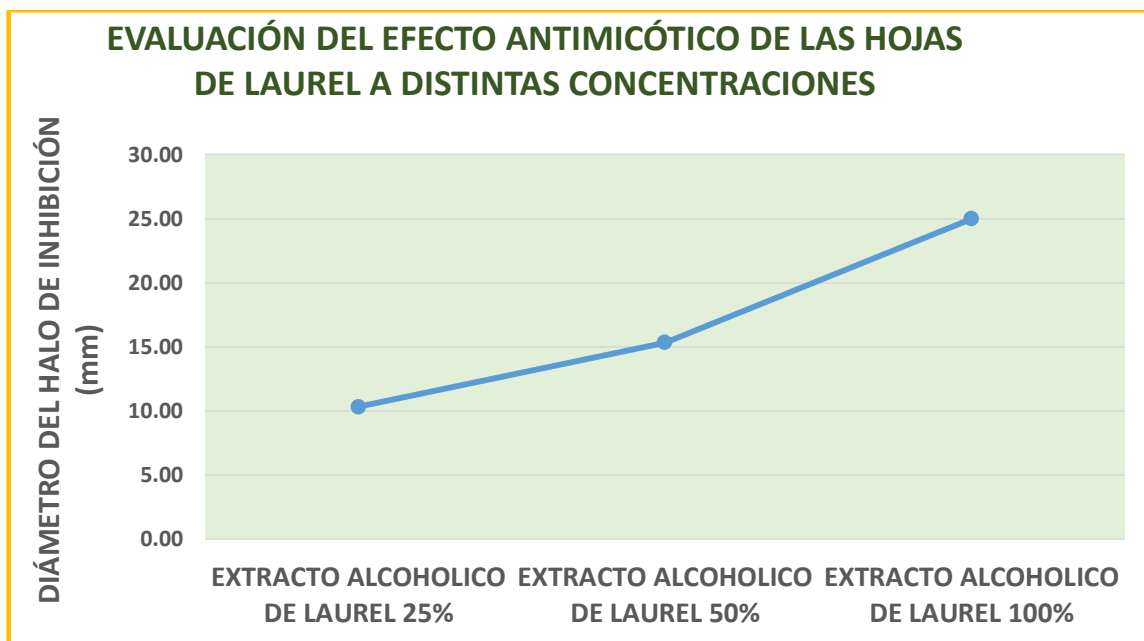


FIGURA 5: Evaluación del efecto antimicótico del extracto de hojas de laurel a distintas concentraciones.



#### 4.1.4 ANALIS ESTADISTICO

Los resultados obtenidos en las diferentes concentraciones del extracto etanólico se analizaron estadísticamente para demostrar el efecto antimicótico de ***Laurus nobilis*** (laurel). Los resultados se muestran en las tablas 9, 10, 11,12 y 13.

TABLA 9: Estadística Descriptiva de los Halos de inhibición encontrados de las hojas secas ***Laurus nobilis*** (Laurel) en cepas de ***Cándida albicans***, In Vitro.

	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Mín.	Máx.
					Límite inferior	Límite superior		
1	3	30,1667	,28868	,16667	29,4496	30,8838	30,00	30,50
2	3	,0000	,00000	,00000	,0000	,0000	,00	,00
3	3	25,0000	1,00000	,57735	22,5159	27,4841	24,00	26,00
4	3	15,3333	,57735	,33333	13,8991	16,7676	15,00	16,00
5	3	10,3333	,57735	,33333	8,8991	11,7676	10,00	11,00
Total	15	16,1667	11,06421	2,85677	10,0395	22,2938	,00	30,50

#### Leyenda:

1 = control positivo (fluconazol 25ug)

2 = control negativo (alcohol de 96°)

3 = extracto etanólico de laurel al 100%

4 = extracto etanólico de laurel al 50%

5 = extracto etanólico de laurel al 25%

En la (tabla 9), podemos observar la aplicación de la estadística descriptiva a los datos obtenidos. Todas las medias se encuentran dentro de los límites establecidos a un intervalo de confianza del 95% y un error relativo del 5% por ello ningún dato se excluye y por ende se aplicará estadística inferencial para establecer si existen diferencias significativas de las medias de cada extracto etanólico estudiado.

TABLA 10: “Prueba de Homogeneidad de Varianzas de los Halos de inhibición encontrados de las hojas secas *Laurus nobilis* (Laurel) en cepas de *Cándida albicans*, In Vitro”

Estadístico de Levene	df1	df2	Sig.
2,311	4	10	,129

**Donde:**

**H<sub>0</sub>** = Las varianzas de los tratamientos aplicados son homogéneos ( $P < 0.05$ )

**H<sub>1</sub>** = Las varianzas de los tratamientos aplicados no son homogéneos ( $P > 0.05$ )

La prueba de homogeneidad de varianzas (tabla 10) nos permite determinar si las varianzas de cada tratamiento aplicado son iguales o diferentes estadísticamente, depende de ello para determinar el tipo de prueba estadística inferencial a ser aplicado. Observamos que  $P > 0.05$ , por lo tanto se concluye que las varianzas de los tratamientos aplicados no son homogéneas, rechazando la hipótesis nula. Es importante el resultado ya que esto nos permite elegir la prueba estadística inferencial correspondiente que en este caso será la prueba ANNOVA ONE WAY o de un factor.

TABLA 11: Prueba de ANOVA de los Halos de inhibición encontrados de las hojas secas *Laurus nobilis* (Laurel) en cepas de *Cándida albicans*, In Vitro.

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1710,333	4	427,583	1221,667	,000
Dentro de grupos	3,500	10	,350		
Total	1713,833	14			

**Donde:**

$H_0$  = No existe diferencias significativas entre los tratamientos aplicados ( $P > 0.05$ )

$H_1$  = Existe diferencias significativas entre los tratamientos aplicados ( $P < 0.05$ )

La prueba ANNOVA One Way (tabla 11), nos permite descifrar si existen diferencias significativas entre los tratamientos aplicados comparando la media de cada uno de ellos. Al observar el resultado ( $P < 0.05$ ) se afirma la hipótesis alternativa, es decir, existe diferencias significativas entre los extractos alcohólicos. Si deseamos determinar que medias son estadísticamente diferentes se debe aplicar pruebas POST HOC, en este caso se aplicará la prueba de TUKEY.

TABLA 12: Comparaciones múltiples de la prueba de Tukey de los Halos de inhibición encontrados de las hojas secas *Laurus nobilis* (Laurel) en cepas de *Cándida albicans*, In Vitro.

(i) concentraci ones	(j) concentraci ones	diferencia de medias (i-j)	error estándar	sig.	95% de intervalo de confianza	
					límite inferior	límite superior
1	2,00	30,16667*	,48305	,000	28,5769	31,7564
	3,00	5,16667*	,48305	,000	3,5769	6,7564
	4,00	14,83333*	,48305	,000	13,2436	16,4231
	5,00	19,83333*	,48305	,000	18,2436	21,4231
2	1,00	-30,16667*	,48305	,000	-31,7564	-28,5769
	3,00	-25,00000*	,48305	,000	-26,5897	-23,4103
	4,00	-15,33333*	,48305	,000	-16,9231	-13,7436
	5,00	-10,33333*	,48305	,000	-11,9231	-8,7436
3	1,00	-5,16667*	,48305	,000	-6,7564	-3,5769
	2,00	25,00000*	,48305	,000	23,4103	26,5897
	4,00	9,66667*	,48305	,000	8,0769	11,2564
	5,00	14,66667*	,48305	,000	13,0769	16,2564
4	1,00	-14,83333*	,48305	,000	-16,4231	-13,2436
	2,00	15,33333*	,48305	,000	13,7436	16,9231
	3,00	-9,66667*	,48305	,000	-11,2564	-8,0769
	5,00	5,00000*	,48305	,000	3,4103	6,5897
5	1,00	-19,83333*	,48305	,000	-21,4231	-18,2436
	2,00	10,33333*	,48305	,000	8,7436	11,9231
	3,00	-14,66667*	,48305	,000	-16,2564	-13,0769
	4,00	-5,00000*	,48305	,000	-6,5897	-3,4103

\*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

#### Leyenda:

1 = control positivo (fluconazol 25ug)

2 = control negativo (alcohol de 96°)

3 = extracto etanólico de laurel al 100%

4 = extracto etanólico de laurel al 50%

5 = extracto etanólico de laurel al 25%

La prueba de TUKEY es una prueba estadística que nos permite realizar comparaciones múltiples y además determina que medias son estadísticamente heterogéneas. En la (tabla 12), observamos que existen diferencias significativas entre todos los extractos y controles tanto negativo y positivo.

TABLA 13: prueba de subconjuntos de datos de tukey de los halos de inhibición encontrados de las hojas secas *Laurus nobilis* (laurel) en cepas de *Candida albicans*, in vitro.

HSD TUKEY<sup>a</sup>

CONCENTRACIONES	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
		1	2	3	4	5
2	3	,0000				
5	3		10,3333			
4	3			15,3333		
3	3				25,0000	
1	3					30,1667
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a: utiliza el tamaño de la muestra de la media armonica=3,000.

**Leyenda:**

1 = control positivo (fluconazol 25ug)

2 = control negativo (alcohol de 96°)

3 = extracto etanólico de laurel al 100%

4 = extracto etanólico de laurel al 50%

5 = extracto etanólico de laurel al 25%

La prueba de TUKEY determina también la homogeneidad de cada concentración. En la (tabla13), se observa que todos los extractos y tanto el control negativo como positivo presentan medias heterogéneas, por ello se deduce que el extracto etanólico de las hojas secas *Laurus nobilis* (Laurel) al 100% presenta el mejor efecto antimicótico frente a *Cándida albicans*.

#### 4.2. Discusión de resultados.

-En ésta investigación, el extracto etanólico al 100% de las hojas secas de ***Laurus nobillis* (laurel)**, de acuerdo a los ensayos efectuados, ha demostrado tener mayor efecto antimicótico, con un halo de inhibición promedio de 25mm, el cual es catalogado como muy sensible y el extracto al 50% demostró tener mediana actividad antimicótica catalogado como sensible, con un halo de inhibición promedio de 15.3 mm frente a las cepas de candida albicans ATCC, in vitro. Por otro lado, en el trabajo de investigación de **Centurión, J. (2014) “Efecto antibacteriano in vitrio del aceite esencial de laurus nobilis (laurel) sobre staphylococcus aureus ATCC 25923”**, demostró que *Laurus nobilis* (laurel) presenta actividad antimicrobiana y antimicótica.<sup>(9)</sup>

-Según el screening fitoquímico realizado al extracto etanólico de las hojas secas de ***Laurus nobilis* (laurel)**, se observó los compuestos químicos como: compuestos fenólicos, cumarinas, taninos, flavonoides y alcaloides (tabla 5). La presencia de taninos, flavonoides y alcaloides son los compuestos químicos a los cuales se les atribuye la actividad antimicótica y antimicrobiana. Por otro lado Cruz, SM. (2013) en su trabajo de investigación “Evaluación biológica y fisicoquímica de extractos de hojas del complejo laurel (***Litsea glaucescens* Kunth, *L. guatemalensis* Mez y *L.neesiana* (Schauer) Hemsl.)**”, demostró que la mayoría de los extractos estudiados presentan compuestos químicos con actividad antimicótica, antimicrobiana y antioxidante.<sup>(11)</sup>

-En éste estudio se comprobó que el “extracto etanólico al 100% de las hojas secas de ***Laurus nobilis* (laurel)**” presenta mayor efecto antimicótico en ***Cándida albicans*** en comparación a las concentraciones de 50% y 25%. Luego de aplicar la estadística inferencial a los resultados, se observa que según ANOVA y TUKEY, indican que si existen diferencias significativas entre los tratamientos aplicados comparando la media de cada uno de ellos.

-El efecto antimicótico del extracto etanólico de las hojas secas de ***Laurus nobilis* (Laurel), in vitro**. De acuerdo a los resultados obtenidos en comparación con el control positivo (**Fluconazol 25ug**) con halo de inhibición promedio de 30.17mm, demostró tener menor efecto antimicótico en cepas de ***candida albicans*** (tabla 7),

## CAPITULO V

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1. CONCLUSIONES.

- La concentración al **100%** y 50% del Extracto etanólico de las hojas secas de ***Laurus nobilis* (laurel)** poseen mayor efecto antimicótico frente a cepas ***Candida albicans***, in vitro.
- El extracto etanólico de las hojas secas de ***Laurus nobilis* (laurel)**, demostró tener menor efecto frente al **fluconazol 25ug**.



## 5.2. RECOMENDACIONES.

- Se recomienda realizar estudios de actividad antimicótica de las hojas secas de ***Laurus nobilis (laurel)*** frente a otras cepas. En la evaluación de la actividad antimicótica hay factores que influyen en los resultados como: el tamaño del inóculo, temperatura, y tiempo de incubación, por ello se debe controlar adecuadamente durante el procedimiento microbiológico y evitar las posibles contaminaciones de otras bacterias ambientales que puedan interferir en el ensayo.
- Proponer el estudio de nuevas plantas que tengan propiedades antimicóticas, y corroborar la eficacia de estas mismas.
- Este estudio es un antecedente para que se continúe con la investigación de esta planta medicinal y se considere como materia prima en la creación de nuevos fármacos con propiedad antimicótica.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

1. Sharapin, N. (2000). Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos. Santafé de Bogotá: Convenio Andrés Bello y CYTED. 247 p
2. Fonegra, R. (2001). Ed. Simposio sobre Plantas Medicinales y Aromáticas, Curso Nacional para el Conocimiento de las Plantas Medicinales y Aromáticas. Documentos Ocasionales No. 2 Herbario Universidad de Antioquia. 349 p.
3. Rippon J.W. (1990). Micología Médica. Hongos y Actinomicetos patógenos. Tercera edición. Interamericana Mc Graw-Hill., México.
4. Pfaller, M. A., Moet, G. J., Messer, S. A., Jones, R. N., & Castanheira, M. (2011). Candida bloodstream infections: Comparison of species distributions and antifungal resistance patterns in community-onset and nosocomial isolates in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program 2008–2009. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 55, 561–566.
5. Mathé, L., & Van Dijck, P. (2013). Recent insights into Candida albicans biofilm resistance mechanisms. Current Genetics, 59, 251–264.
6. Conforti F, Statti G, Uzunov D, Menichini F. Comparative chemical composition and antioxidant activities of wild and cultivated Laurus nobilis L. leaves and Foeniculum vulgare subsp. piperitum (Ucria) Coutinho seeds. Biol Pharm Bull 2006, 29(6): 2056-64.
7. Pérez F, et al. Mezcla de extractos de plantas medicinales: ¿Sinergismo o reacción química?. Researchgate. Pueblo cont. 2010, 21(1): 239-242.
8. Chuquitarqui LZ, Valdivia FA. “Estudio Fitoquímico preliminar y evaluación del efecto diurético del extracto de *Laurus nobilis* “Laurel” en animales de experimentación”. [Tesis de grado]. Arequipa – Perú: Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas y Biotecnológicas. Universidad Católica de Santa María; 2013.
9. Centurión, J. Efecto antibacteriano in vitro del aceite Esencial de *Laurus nobilis* “Laurel” sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. [Tesis de

- grado].Facultad de Medicina Humana. Escuela Profesional de Medicina Humana. Universidad Privada Antenor Orrego; 2014.
- 10.**Ocares MA.** Acción antimicrobiana de extractos crudos de especies de plantas nativas sobre *Escherichia coli* y *Salmonella* spp [Tesis de grado].Valdivia-Chile: Facultad de Ciencias Agrarias Escuela de Ingeniería en Alimentos. Universidad Austral de Chile; 2012.
  - 11.Cruz, SM. “Evaluación biológica y fisicoquímica de extractos de hojas del complejo laurel (*Litsea glaucescens* Kunth, *L. guatemalensis* Mez y *L.neesiana* (Schauer) Hemsl.)”. [Tesis Doctoral].Guatemala: Universidad Nacional de Costa Rica; Agosto 2013.
  - 12.**Rozo MC.** Metabolitos secundarios aislados de hojas de *Ocotea heterochroma* (Lauraceae). [Tesis de grado].Bogóta-Colombia: Facultad de Ciencias, Departamento de Química. Universidad Nacional de Colombia; 2015.
  - 13.López G., *Guía de los árboles y arbustos de la Península Ibérica y Baleares*. Mundi-Prensa Libros, 2001
  - 14.Forman, L. & Bridson, D. (eds.). *The herbarium handbook*, Royal Botanic Gardens, Kew, 1989. ISBN 0-947643-20-6.
  - 15.Conforti F, Statti G, Uzunov D, Menichini F. Comparative chemical composition and antioxidant activities of wild and cultivated *Laurus nobilis* L. leaves and *Foeniculum vulgare* subsp. *piperitum* (Ucria) Coutinho seeds. *Biol Pharm Bull* 2006, 29(6): 2056-64.
  - 16.Chaudhry NM, Tariq P. Bactericidal activity of black pepper, bay leaf, aniseed and coriander against oral isolates. *Pak J Pharm Sci* 2006, 19(3): 214-8.
  - 17.Kuklinski, Claudia. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural, *Farmacognosia*. Barcelona: Omega; 2003.
  - 18.Rippon J.W. (1990). *Micología Médica. Hongos y Actinomicetos patógenos*. Tercera edición. Interamericana Mc Graw-Hill., México.

19. J. Pontón, MD Moragues, J. Gené, J. Guarro, G. Quindós. Hongos y actinomicetos alérgicos. Revista Iberoamericana de Micología, Bilbao, 2002.
20. Villar J. y Alhambra A. Epidemiología de las candidiasis invasoras en población pediátrica y adulta. Rev Iberoam Micol. 2009; 26(1):2-7.
21. Kwong-Chung K.J., Bennet M.D. (1992). Medical Micology. Lea & Febiger. Philadelphia – London.
22. Pappas P y col. Clinical practice guidelines for the management of Candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. Clinical Infectious Diseases, 2009; 48:503-35.
23. Gregori Valdez S.: Estructura y actividad de los antifúngicos. Rev Cubana Farm Vol39, Nº2 Ciudad de la Habana MayoAgo. 2005.
24. Catalán M., Montejo J. C.: Antifúngicos sistémicos. Farmacodinamia y farmacocinética. Rev Iberoam Micol 2006; 23: 39-49 3
25. <http://tesis.ucsm.edu.pe/repositorio/handle/UCSM/3850>
26. <http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/f025.htm>
27. <http://candialbicans.blogspot.com/>
28. <http://salud.ccm.net/faq/7748-antifungicos-o-antimicoticos-definición/>
29. <https://es.wikipedia.org/wiki/Extraccion>.
30. <https://es.wikipedia.org/wiki/Solubilidad>
31. Massaro RA. Aplicación terrestre de plaguicidas: ¡hay que cambiar la forma de trabajar! Los barbechos químicos ofrecen una gran oportunidad. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Artículo Técnico. 2013;1-4.

## ANEXOS

### ANEXO: 1



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS  
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA  
CENPROFARMA

CENTRO DE CONTROL ANALÍTICO - CCA



### PROTOCOLO DE ANÁLISIS N.º00442-CPF-2017

ORDEN DE ANÁLISIS  
SOLICITADO POR  
MUESTRA  
NÚMERO DE LOTE  
CANTIDAD  
FECHA DE RECEPCIÓN

: 004629/2017  
: JULIA LUCÍA CRUZ VALVERDE  
: CECILIA QUISPE CAUNALLA  
: HOJAS DE LAUREL  
: ---  
: 02 Kg.  
: 24 de Noviembre del 2017

MICROORGANISMO	CONTROLES			MUESTRA		
	HALO DE INHIBICIÓN (mm)			HALO DE INHIBICIÓN (mm)		
	ETANOL					
<i>Candida albicans</i>	0	0	0	100%		
	FLUCONAZOL 25 µg					
	30	30	30,5			
				25	24	26
				50%		
				15	15	16
				25%		
				10	11	10

Lima, 19 de Diciembre del 2017



  

**Dra. María Elena Salazar Salvatierra**  
Directora (e) del Centro de Control Analítico



**"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"**

Jr. Puno N° 1002 Jardín Botánico Lima 1 - Perú  
☎ (511) 619-7000 anexo 4824 ✉ Ap. Postal 4559 - Lima 1  
E-mail: cca.farmacia@unmsm.edu.pe <http://farmacia.unmsm.edu.pe>

**ANEXO: 2 TÉCNICA ANALÍTICA – EXTRACTO ETANÓLICO DE HOJAS DE LAUREL.**



FIGURA 6: Hojas lavadas



FIGURA 7: Hojas en la estufa

**ANEXO :2 TÉCNICA ANALÍTICA – EXTRACTO ETANÓLICO DE HOJAS DE LAUREL. (CONTINUA)**



FIGURA 8: Triturado de hojas en mortero

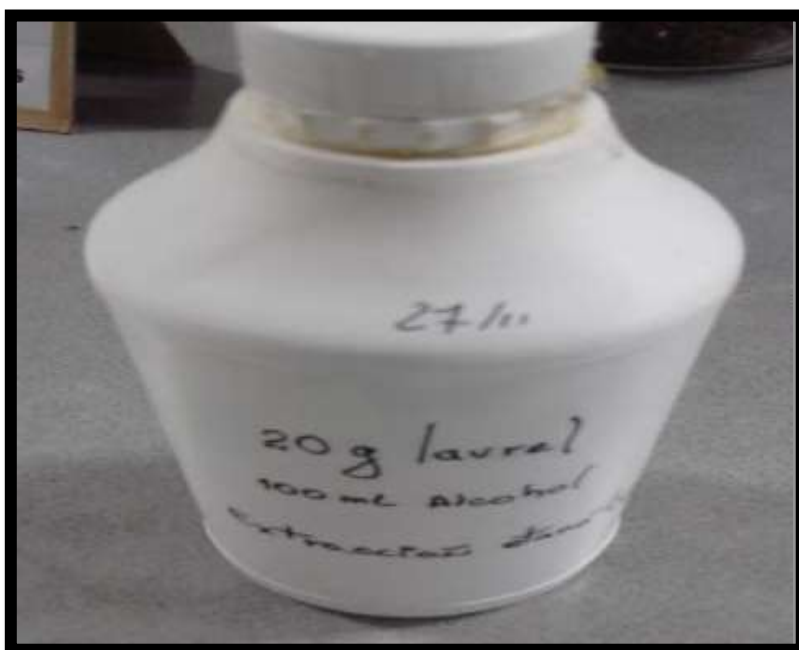


FIGURA 9: Hojas pulverizadas en frasco de polietileno con etanol



**ANEXO :2 TÉCNICA ANALÍTICA – EXTRACTO ETANÓLICO DE HOJAS DE LAUREL. (CONTINUA)**



FIGURA 10: Filtrado del extracto

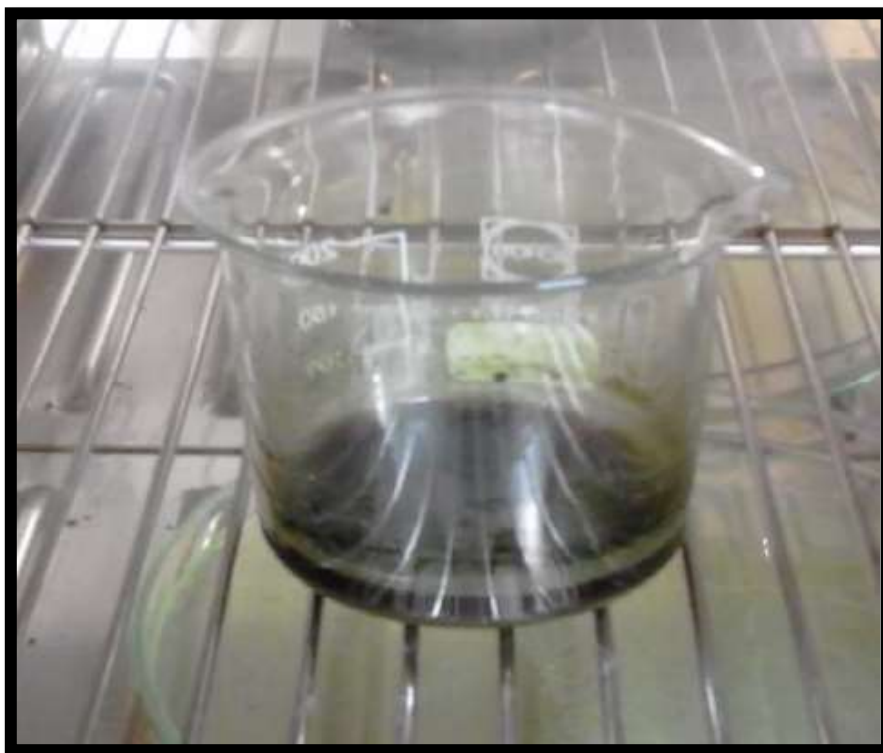


FIGURA 11: Extracto en la estufa



**ANEXO: 3 FOTOS DE ANÁLISIS DE EFECTO ANTIMICÓTICO**



FIGURA 12: Agar Mueller Hinton plaqueado y listo para ser inoculado



FIGURA 13: Inoculación del microorganismo en la placa.

**ANEXO: 3 FOTOS DE ANÁLISIS DE EFECTO ANTIMICOTICO (CONTINUA)**



FIGURA 14: Realizando los hoyos en el agar



FIGURA 15: Placa con los pocillos listos.

**ANEXO: 3 FOTOS DE ANÁLISIS DE EFECTO ANTIMICOTICO (CONTINUA)**



FIGURA 16: Muestra a tres diluciones



FIGURA 17: Cepa de *Cándida albicans* ATCC.

**ANEXO: 3 FOTOS DE ANÁLISIS DE EFECTO ANTIMICÓTICO (CONTINUA)**



FIGURA18: Microorganismo en solución

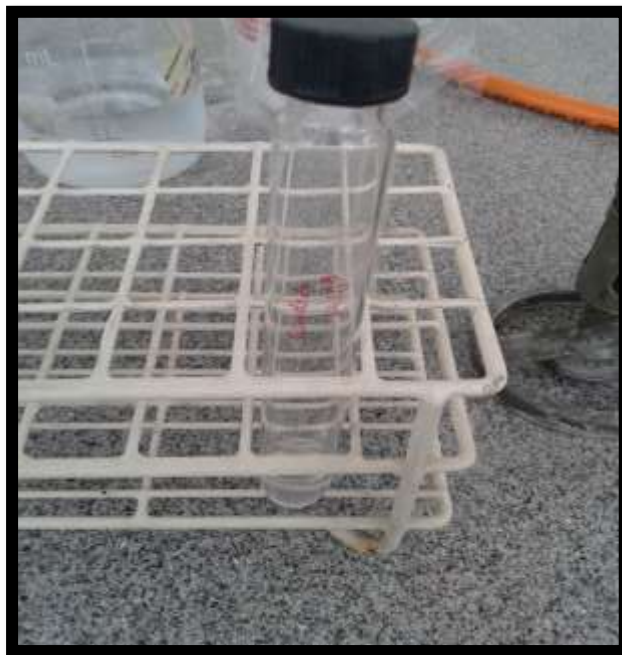


FIGURA 19: Observación de la turbidez basada en escala de Macfarland



**ANEXO: 3 FOTOS DE ANÁLISIS DE EFECTO ANTIMICÓTICO (CONTINUA)**



FIGURA 20: Agar Mueller Hinton plaqueado y listo para ser inoculado



FIGURA 21: Inoculación del microorganismo en la placa

**ANEXO: 3 FOTOS DE ANÁLISIS DE EFECTO ANTIMICÓTICO ( CONTINUA)**



FIGURA 22: Placa con los pocillos listos



FIGURA 23: Aplicación de la muestra al 25% en los discos

**ANEXO: 3 FOTOS DE ANÁLISIS DE EFECTO ANTIMICÓTICO ( CONTINUA)**



FIGURA 24: Aplicación de la muestra al 50% en los discos

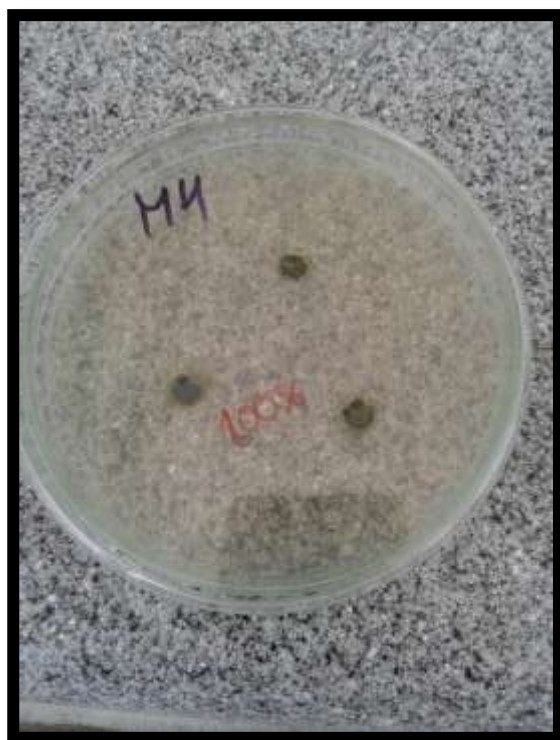


FIGURA 25: Aplicación de la muestra al 100% en los discos.

**ANEXO: 3 FOTOS DE ANÁLISIS DE EFECTO ANTIMICÓTICO ( CONTINUA)**



FIGURA 26: Colocación de los discos en las placas



FIGURA 27: Resultado del crecimiento del halo inhibitorio de la muestra al 25%.



**ANEXO: 3 FOTOS DE ANÁLISIS DE EFECTO ANTIMICÓTICO (CONTINUA)**



FIGURA 28: Resultado del crecimiento del halo inhibitorio de la nuestra al 50%



FIGURA 29: Resultado del crecimiento del halo inhibitorio de la nuestra al 100%

**ANEXO: 3 FOTOS DE ANÁLISIS DE EFECTO ANTIMICÓTICO (CONTINUA).**



FIGURA 30: Foto en el laboratorio de microbiología

## ANEXO: 4 CERTIFICACIÓN BOTÁNICA

Hamilton W. Beltrán S.  
Consultor Botánico  
Calle Nataño Sánchez 251- Jesús María  
hamiltonbeltran@yahoo.com

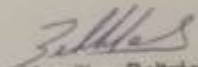
### CERTIFICACION BOTANICA

El Biólogo colegiado y autorizado por el Inrena según RD. N° 334-2013-MINAGRI-DGFFS/DGEFFS, con Registro N° 37, certifica que la planta conocida como "LAUREL" proporcionada por las Srtas. CECILIA QUISPE CAUNALLA y JULIA LUCIA CRUZ VALVERDE, ha sido estudiada científicamente y determinada como Laurus nobilis y de acuerdo al Sistema de Clasificación de Cronquist 1981, se ubica en las siguientes categorías:

Reino: Plantae  
División: Magnoliophyta  
Clase: Magnoliopsida  
Subclase: Magnoliidae  
Orden: Laurales  
Familia: Lauraceae  
Género: Laurus  
Especie: Laurus nobilis L.

Se expide la presente certificación a solicitud de las interesadas para los fines que estime conveniente.

Lima, 16 noviembre 2017

  
Bigo. Hamilton Beltrán

Hamilton W. Beltrán Santiago  
Biólogo - Botánico  
C.R. 2719

## **ANEXO 5:**



### **UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICA**

#### **FICHA DE OBSERVACIÓN AD-HOC DE PRUEBA DE SOLUBILIDAD**

#### **EFEECTO ANTIMICÓTICO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS HOJAS SECAS DE *Laurus nobilis* (LAUREL) EN CEPAS DE *Candida albicans*, IN VITRO.**

#### **INSTRUCCIONES**

- Antes de iniciar con la observación, procure encontrarse en un estado de equilibrio emocional y somático.
- Si se siente cansado, estresado o enfermo, suspenda la observación.
- Procure realizar todas las mediciones bajo las mismas condiciones de comodidad.
- En el caso de no tener certeza sobre la medición de alguna unidad de análisis, descarte su evaluación.
- Registre los datos sin borrones ni enmendaduras.

	<b>DEMOSTRACION</b>	<b>IDENTIFICACION</b>	<b>RESULTADOS</b>
<b>ACETATO DE ETILO</b>	1ml extracto + 1ml del reactivo	Soluble o insoluble	
<b>CICLOHEXANO</b>	1ml extracto + 1ml del reactivo	Soluble o insoluble	
<b>METANOL</b>	1ml extracto + 1ml del reactivo	Soluble o insoluble	
<b>BUTANOL</b>	1ml extracto + 1ml del reactivo	Soluble o insoluble	
<b>ETER DE PETROLEO</b>	1ml extracto + 1ml del reactivo	Soluble o insoluble	
<b>ETANOL</b>	1ml extracto + 1ml del reactivo	Soluble o insoluble	
<b>AGUA DESTILADA</b>	1ml extracto + 1ml del reactivo	Soluble o insoluble	

Leyenda: Soluble (++), Poco Soluble (+), insoluble (-)

**ANEXO: 6**

**UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA  
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUÍMICA  
FICHA DE OBSERVACIÓN AD-HOC DE SCREENING  
FITOQUÍMICO**

**“EFECTO ANTIMICÓTICO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS HOJAS SECAS  
*Laurus nobilis* (LAUREL) EN CEPAS DE *Cándida albicans*, IN VITRIO.”**

- Al inicio de la observación, procure encontrarse en un estado de equilibrio emocional y somático.
- Si en caso se siente cansado, estresado o enfermo, suspenda la observación.
- Realizar todas las mediciones bajo las mismas condiciones de comodidad.
- Si no tiene certeza sobre la medición de alguna unidad de análisis, descarte su evaluación.
- Registre los datos sin borrones ni enmendaduras.

SCREENING FITOQUIMICO				
	REACTIVO	DEMOSTRACION	IDENTIFICACION	RESULTADOS
IDENTIFICACION DE COMPUESTOS FENOLICOS	FeCl <sub>3</sub>	2ml extracto + 5 gotas del reactivo	Cambio de coloración pardo a azul	
IDENTIFICACION DE CUMARINAS	NaoH 10%	2ml extracto + 2 gotas del reactivo	Amarillo intenso	
IDENTIFICACION DE TANINOS	Rvo Gelatina + NaCl	2ml extracto + 5 gotas de reactivo + 3 gotas de NaCl 10%	Coloide	
IDENTIFICACION DE SAPONINAS	H <sub>2</sub> O	2ml extracto + 1ml de H <sub>2</sub> O destilada agitación por 2 minutos	Forma espuma	
IDENTIFICACION DE FLAVONOIDES	Limaduras de Magnesio (Mg)	2ml extracto + 7 gotas del reactivo (agitar) colocar 1gota de HCl al 10%	Cambio de coloración a verde petróleo tenue	
IDENTIFICACIÓN DE ALCALOIDES	Reactivo Dragendor	2ml extracto + 3 gotas del reactivo	Precipitado color anaranjado	
	Reactivo mayer	2ml extracto + 3 gotas del reactivo	Precipitado color blanco lechoso	
	Reactivo wagner	2ml extracto + 3 gotas del reactivo	Precipitado color marrón	

Legenda: (+ +) Moderado, (+ + +) Abundante, (-) Ausente.

## ANEXO: 7



UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA  
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICA

FICHA DE OBSERVACION AD-HOC DE RECOLECCIÓN DE DATOS

**“EFECTO ANTIMICÓTICO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS HOJAS SECAS  
*Laurus nobilis* (LAUREL) EN CEPAS DE *Cándida albicans*, IN VITRIO.”**

### METODO DE KIRBY BAUER

#### RECOMENDACIONES

- Al inicio de la observación, procure encontrarse en un estado de equilibrio emocional y somático.
- Si en caso se siente cansado, estresado o enfermo, suspenda la observación.
- Realizar todas las mediciones bajo las mismas condiciones de comodidad.
- Si no tiene certeza sobre la medición de alguna unidad de análisis, descarte su evaluación.
- Registre los datos sin borrones ni enmendaduras.
- Los espacios en los que no pueda registrar información, táchelos con una línea.

MICROORGANISMO	CONTROLES			MUESTRA		
	HALO DE INHIBICION (mm)			EXTRACTO ETANOLICO DE LAURUS NOBILIS (LAUREL)		
	ALCOHOL ETILICO 96°			HALO DE INHIBICION (mm)		
Candida albicans ATCC 10231	0.00	0.00	0.00	100%		
	FLUCONAZOL 25ug					
				50%		
				25%		

**ANEXO: 8****Ficha de Validación por Juicio de Experto.**

**UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA  
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICA**

**HOJA DE VALIDACION DEL INSTRUMENTO CUSTIONARIO AD-HOC DE LA  
PRUEBA DE SOLUBILIDAD DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS HOJAS SECAS  
*Laurus nobilis* (LAUREL)**

Después de revisado el instrumento, es valiosa su opinión acerca de lo siguiente:

**MENOS DE**

**50 – 60 – 70 – 80 – 90 – 100**

1. ¿En qué porcentaje estima que con este instrumento se lograrán los objetivos propuestos?.....( ) ( ) ( ) ( ) ( ) ( )
2. ¿En qué porcentaje considera que los ítems están referidas a los conceptos del tema?.....( ) ( ) ( ) ( ) ( ) ( )
3. ¿Qué porcentaje de un ítems planteados cree que son suficientes para lograr los objetivos?.....( ) ( ) ( ) ( ) ( ) ( )
4. ¿En qué porcentaje estima que los ítems del instrumento son de fácil comprensión?.....( ) ( ) ( ) ( ) ( ) ( )
5. ¿Qué porcentaje de los ítems considera usted que siguen una secuencia logica?.....( ) ( ) ( ) ( ) ( ) ( )
6. ¿En qué porcentaje valora usted que con este instrumento se obtendrán datos similares si se explicara en otras muestras?.....( ) ( ) ( ) ( ) ( ) ( )

**SUGERENCIAS**

1. ¿Qué ítems considera usted que deberían agregarse?

.....  
.....

2. ¿Qué ítems estima que deberían eliminarse?

.....  
.....  
.....

3. ¿Qué ítems considera que deberán reformularse o precisarse mejor?

.....  
.....

**Fecha:**.....

**Validado por:**.....

**ANEXO: 9****Ficha de Validación por Juicio de Experto.**

**UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA  
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICA**

**HOJA DE VALIDACION DEL INSTRUMENTO  
CUESTIONARIO AD-HOC DE RECOLECCION DE DATOS DEL SCREENING  
FITOQUÍMICO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS HOJAS SECAS *Laurus nobilis* (LAUREL).**

Después de revisado el instrumento, es valiosa su opinión acerca de lo siguiente:

**MENOS DE**

**50 – 60 – 70 – 80 – 90 – 100**

7. ¿En qué porcentaje estima que con este instrumento se lograrán los objetivos propuestos?.....( ) ( ) ( ) ( ) ( ) ( )
8. ¿En qué porcentaje considera que los ítems están referidas a los conceptos del tema?.....( ) ( ) ( ) ( ) ( ) ( )
9. ¿Qué porcentaje de un ítems planteados cree que son suficientes para lograr los objetivos?.....( ) ( ) ( ) ( ) ( ) ( )
10. ¿En qué porcentaje estima que los ítems del instrumento son de fácil comprensión?.....( ) ( ) ( ) ( ) ( ) ( )
11. ¿Qué porcentaje de los ítems considera usted que siguen una secuencia lógica?.....( ) ( ) ( ) ( ) ( ) ( )
12. ¿En qué porcentaje valora usted que con este instrumento se obtendrán datos similares si se explicara en otras muestras?.....( ) ( ) ( ) ( ) ( ) ( )

**SUGERENCIAS**

**4. ¿Qué ítems considera usted que deberían agregarse?**

.....  
.....

**5. ¿Qué ítems estima que deberían eliminarse?**

.....  
.....  
.....

**6. ¿Qué ítems considera que deberán reformularse o precisarse mejor?**

.....  
.....

**Fecha:**.....

**Validado por:**.....



**ANEXO: 10****Ficha de Validación por Juicio de Experto.**

**UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA  
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICA**

**HOJA DE VALIDACION DEL INSTRUMENTO  
CUSTIONARIO AD-HOC DE RECOLECCION DE DATOS**

**“EFECTO ANTIMICÓTICO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS HOJAS SECAS  
*Laurus nobilis* (LAUREL) EN CEPAS DE CÁNDIDA ALBICANS, IN VITRIO.”**

Después de revisado el instrumento, es valiosa su opinión acerca de lo siguiente:

**MENOS DE**

**50 – 60 – 70 – 80 – 90 – 100**

13. ¿En qué porcentaje estima que con este instrumento se logran los objetivos propuestos?.....( ) ( ) ( ) ( ) ( ) ( )

14. ¿En qué porcentaje considera que los ítems están referidas a los conceptos del tema?.....( ) ( ) ( ) ( ) ( ) ( )

15. ¿Qué porcentaje de un ítems planteados cree que son suficientes para lograr los objetivos?.....( ) ( ) ( ) ( ) ( ) ( )

16. ¿En qué porcentaje estima que los ítems del instrumento son de fácil comprensión?.....( ) ( ) ( ) ( ) ( ) ( )

17. ¿Qué porcentaje de los ítems considera usted que siguen una secuencia logica?.....( ) ( ) ( ) ( ) ( ) ( )

18. ¿En qué porcentaje valora usted que con este instrumento se obtendrán datos similares si se explicara en otras muestras?.....( ) ( ) ( ) ( ) ( ) ( )

**SUGERENCIAS**

**7. ¿Qué ítems considera usted que deberían agregarse?**

.....  
.....

**8. ¿Qué ítems estima que deberían eliminarse?**

.....  
.....  
.....

**9. ¿Qué ítems considera que deberán reformularse o precisarse mejor?**

.....  
.....

**Fecha:**.....

**Validado por:**.....

## ANEXO: 11 Matriz de consistencia.

“EFECTO ANTIMICOTICO DEL EXTRACTO ETANOLICO DE LAS HOJAS SECAS DE <i>Laurus nobilis</i> (LAUREL) EN CEPAS DE <i>Candida albicans</i> , IN VITRO”						
PROBLEMA GENERAL	OBJETIVO GENERAL	HIPÓTESIS GENERAL	OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES		METODOLOGÍA	INTRUMENTOS
			VARIABLE INDEPENDIENTE	INDICADORES	ENFOQUE	
¿El extracto etanólico de las hojas secas de <i>Laurus nobilis</i> (LAUREL) presenta efecto antimicótico de cepas <i>Candida albicans</i> , in vitro?	Determinar si el extracto etanólico de las hojas secas de <i>Laurus nobilis</i> (Laurel) tiene efecto antimicótico en cepas de <i>Cándida albicans</i> , in vitro.	El extracto etanólico de las hojas secas de <i>Laurus nobilis</i> (Laurel) presenta efecto antimicótico en cepas <i>cándida albicans</i> , in vitro.	Extracto etanólico de las hojas secas de <i>Laurus nobilis</i> (Laurel).	Concentración 25%,50%, 100%	cuantitativo	-cepas de <i>Cándida albicans</i> ATCC 10231, -Medios de cultivo (agar nutritivo) y reactivos (etanol 96 °) -incubadora -autoclave -vernier -placas Petri -sacabocado
PROBLEMAS ESPECÍFICOS	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	HIPÓTESIS ESPECÍFICAS	VARIABLE DEPENDIENTE	INDICADORES	NIVEL	
¿Cuál es la concentración del extracto etanólico de las hojas secas de <i>Laurus nobilis</i> (laurel) que presenta efecto antimicótico en cepas <i>Candida albicans</i> , in vitro?	Determinar que concentración del extracto etanólico de las hojas secas de <i>Laurus nobilis</i> (Laurel) tiene efecto antimicótico en cepas <i>cándida albicans</i> , in vitro.	La concentración del extracto etanólico de las hojas secas de <i>Laurus nobilis</i> (Laurel) presenta efecto antimicótico en cepas <i>Cándida albicans</i> , in vitro.	Efecto antimicótico	<i>Cándida albicans</i> Halo inhibitorio	experimental	
¿Cuál será el efecto antimicótico del extracto etanólico de las hojas secas de <i>Laurus nobilis</i> (Laurel) frente al fluconazol 25ug en cepas <i>cándida albicans</i> , in vitro?	Comparar el efecto antimicótico del extracto etanólico de las hojas secas de <i>Laurus nobilis</i> (Laurel) con el fluconazol 25ug en cepas <i>cándida albicans</i> , in vitro.	El extracto etanólico de las hojas secas de <i>Laurus nobilis</i> (Laurel) presenta efecto antimicótico frente al fluconazol 25ug en cepas <i>Cándida albicans</i> , in vitro			DISEÑO	
					Ensayo	

